

# Anemia Aplástica Adquirida

Monografia do 2º Ciclo de estudos conducente ao grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Alice Santos Silva e  
coorientação da Professora Doutora Susana Coimbra

Catarina Cruz Vaz

Novembro de 2016

*À memória de  
José Fernando dos Santos  
(1955 – 2016)*

## Agradecimentos

Dedico este espaço para agradecer a todos aqueles que, ainda que em diferentes aspetos, foram fundamentais à realização da presente monografia, tendo contribuído para a sua concretização.

Começo por agradecer à Professora Doutora Alice Santos Silva e à Professora Doutora Susana Coimbra por se terem disponibilizado a orientar-me na elaboração desta monografia prestando-me um constante apoio, pelos conhecimentos transmitidos e por terem contribuído, com o seu espírito crítico, para a minha evolução como futura profissional de Análises Clínicas.

Agradeço também às pessoas fantásticas com quem tive o prazer de partilhar a experiência do Mestrado em Análises Clínicas, algumas delas desde a Licenciatura em Bioquímica, e que sempre me acompanharam nesta fase crucial do mesmo, por serem um exemplo de companheirismo, amizade e carinho. Levo-vos comigo, sempre.

Aos meus amigos – os de sempre e para sempre, que sabem bem o lugar que ocupam em mim – por estarem sempre presentes, de corpo e alma, pelos momentos que vivemos, por me darem força e me lembrarem sempre do que realmente é importante.

Ao Pedro, pelo amor sem medida, e aos pais, para quem me faltam as palavras para descrever o quanto são importantes para mim.

Por último, com plena consciência do quanto o seu apoio incondicional permitiu dar à grande aventura que foi o meu percurso académico um final feliz, deixo um enorme agradecimento à minha Mãe e à minha Avó, a quem tudo devo. Agradeço ainda à família mais próxima.

A todos, o meu muito obrigada.

## Resumo

A anemia aplástica adquirida severa é uma doença hematológica grave e pouco frequente. Esta patologia caracteriza-se por hipoplasia da medula óssea, que afeta todas as linhagens celulares hematopoiéticas, e pancitopenia progressiva.

O mecanismo fisiopatológico que se pensa estar associado a esta patologia tem como base uma resposta imune exacerbada desencadeada por linfócitos T citotóxicos, dirigida contra as células progenitoras hematopoiéticas. A esta resposta imune está associado um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferão- $\gamma$  e o fator de necrose tumoral- $\alpha$ . No entanto, outros mecanismos foram também propostos, como a produção de autoanticorpos contra as células estaminais hematopoiéticas, e a inibição da diferenciação celular por falta de suporte por parte das células mesenquimais, produtoras de citocinas importantes para o processo hematopoiético.

O diagnóstico desta patologia é um diagnóstico de exclusão, que envolve um conjunto de meios complementares de diagnóstico muito abrangente e complexo, nomeadamente a nível hematológico, imagiológico e de citogenética. O diagnóstico diferencial tem uma grande importância na abordagem clínica ao doente.

O tratamento específico convencional inclui a terapêutica imunossupressora e o transplante de células estaminais hematopoiéticas da medula óssea. A taxa de sobrevivência dos doentes com anemia aplástica adquirida tem melhorado substancialmente nas últimas décadas, graças à evolução dos procedimentos de transfusão e de transplante, das terapêuticas imunossupressoras e dos cuidados continuados ou de suporte. Nos doentes em que o tratamento não se revela bem-sucedido, as causas de morte mais comuns são eventos hemorrágicos e infeções generalizadas.

Nos últimos anos, têm-se tentado implementar novos métodos de diagnóstico e prognóstico, bem como alternativas às terapêuticas convencionais. Particularmente importante é adequar a abordagem ao doente, oferecendo-lhe alternativas de tratamento adequadas à sua história clínica, ao seu quadro clínico e às comorbilidades que apresenta. Em suma, para além da restituição da hematopoiese para níveis fisiologicamente aceitáveis, a abordagem clínica do doente com anemia aplástica adquirida deve visar também a melhoria da qualidade de vida dos doentes.

**Palavras-chave:** anemia aplástica adquirida, resposta imune exacerbada, diagnóstico diferencial, tratamento de imunossupressão, transplante de células hematopoiéticas

## Abstract

Acquired severe aplastic anaemia is a serious and rare haematological disorder. This pathology is characterized by hypoplasia of the bone marrow, which affects all hematopoietic cell lines, and progressive pancytopenia.

An exacerbate immune response triggered by cytotoxic T lymphocytes and directed against bone marrow hematopoietic progenitor cells is believed to be the most important mechanism of acquired aplastic anaemia. This immune process associates with an increased production of pro-inflammatory cytokines, such as interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ . However, other pathophysiologic mechanisms have been proposed, namely production of autoantibodies against hematopoietic stem cells, and inhibition of cellular differentiation by lack of support by mesenchymal cells, which produce cytokines that are important in hematopoietic process.

The diagnosis of this pathology is a diagnostic of exclusion, comprising a very complex set of supplementary diagnostic procedures, namely haematological, medical imaging and cytogenetic procedures. Differential diagnosis is of great importance on the clinical approach to the patient and their clinical outcome.

The standard treatment for acquired aplastic anaemia includes immunosuppression therapy and bone marrow hematopoietic stem cell transplant. The overall survival rate for patients suffering from acquired aplastic anaemia has substantially improved over the last few decades, thanks to advances in transfusional and transplantation procedures, and in immunosuppressive and support therapies. In case of unsuccessful treatment, the most frequent causes of death are haemorrhagic events and serious generalized infections.

Over the last few years, new diagnosis and prognosis assessment methods have been under clinical investigation, as well as new and alternative immunosuppressive therapies and conditioning regimens for transplantation. To improve patients' clinical outcome, an oriented clinical approach with therapies adequate to the patient medical history, their overall clinical status and comorbidities, is needed.

In summary, the re-establishment of haematopoiesis to physiological levels and the improvement of patients' quality of life should be the main focus of the clinical approach in acquired aplastic anaemia.

**Keywords:** acquired aplastic anemia, exacerbate immune response, differential diagnosis, immunosuppression therapy, bone marrow hematopoietic stem cell transplant

## Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract.....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	ix
Abreviaturas.....	x
Introdução .....	1
Epidemiologia e severidade .....	3
Incidência por área geográfica .....	3
Incidência por género e faixa etária .....	3
Morbilidade e mortalidade.....	3
Critérios de definição da severidade da doença .....	4
Etiologia e Fisiopatologia .....	5
Mecanismos fisiopatológicos propostos .....	5
Apoptose pela via Fas/Fas-L.....	6
Mecanismos de imunidade inata .....	7
Aspetos genéticos predisponentes e antígenos envolvidos.....	7
Outros aspetos da imunidade adquirida .....	9
Papel imunológico das células mesenquimais .....	9
Fatores etiológicos possíveis .....	10
Estudo clínico e laboratorial .....	12
Exame físico e historial clínico do doente.....	12
Avaliação laboratorial e imagiológica .....	12
Estudo do sangue periférico .....	13
Estudo da medula óssea .....	13
Estudo imagiológico .....	15
Critérios de diagnóstico e severidade.....	15
Diagnóstico diferencial .....	16

Exclusão de formas congénitas de aplasia medular e de HPN.....	17
Exclusão de neoplasias do sistema hematológico .....	19
Exclusão de patologias autoimunes .....	21
Exclusão de outras patologias .....	21
Métodos emergentes de diagnóstico e prognóstico .....	21
Biomarcadores preditivos da evolução do quadro clínico e resposta à terapêutica.....	22
Tratamento .....	24
Tratamento de suporte.....	24
Transfusão de produtos sanguíneos.....	24
Prevenção de infeções em doentes neutropénicos .....	25
Tratamento específico.....	25
Terapia imunossupressora .....	25
Transplante de células estaminais hematopoiéticas .....	28
Novas estratégias de abordagem ao doente .....	30
Alemtuzumab .....	31
Eltrombopag.....	32
Ciclofosfamida.....	32
Abordagens terapêuticas específicas.....	33
Tratamento da AA no idoso.....	33
Tratamento da AA na grávida.....	34
CrITÉRIOS de avaliação da resposta ao tratamento .....	34
Conclusão.....	36
Bibliografia.....	38

## Índice de figuras

Figura 1. Visualização de um fragmento de medula óssea hipocelular .....	15
Figura 2. Secção de corte histológico de medula óssea hipocelular .....	15
Figura 3. Diagrama de sobreposição da AA e de outras patologias hematológicas.....	17
Figura 4. Aspirado da medula óssea de um doente com mielodisplasia .....	20



## Índice de tabelas

Tabela 1 - Causas de anemia aplástica .....	2
Tabela 2. Critérios de definição da severidade da aplasia medular.....	16

## Abreviaturas

<b>AA</b>	Anemia aplástica
<b>ATG</b>	Globulina anti-timocítica ( <i>anti-thymocyte globulin</i> )
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CSA</b>	Ciclosporina A
<b>DC</b>	Células dendríticas ( <i>dendritic cells</i> )
<b>EPO</b>	Eritropoietina
<b>Fas-L</b>	Fas-ligando
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>GVHD</b>	Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro ( <i>graft-versus-host disease</i> )
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana ( <i>human immunodeficiency vírus</i> )
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário humano ( <i>human leukocyte antigen</i> )
<b>HPN</b>	Hemoglobinúria paroxística noturna
<b>IAAAS</b>	<i>International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferão $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>JAK/STAT</b>	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
<b>LMA</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MHC</b>	Complexo maior de histocompatibilidade ( <i>major hystocompatibility complex</i> )
<b>NK</b>	Células <i>natural killer</i>
<b>SAAWP - EBMT</b>	<i>Severe Aplastic Anemia Working Party - European Society for Blood and Marrow Transplantation</i>
<b>SMD</b>	Síndrome mielodisplásico
<b>SNP</b>	<i>Single-nucleotide polymorphisms</i>
<b>SNP-A</b>	<i>Single-nucleotide polymorphisms array</i>
<b>T-bet</b>	<i>T-box expressed in T cells</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento (de <i>transforming growth factor</i> $\beta$ )
<b>Th</b>	Células <i>T helper</i>
<b>TNFR</b>	Recetor de TNF
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$ (de <i>tumour necrosis factor</i> $\alpha$ )

<b>TPO</b>	Trombopoietina
<b>Treg</b>	Células T reguladoras

## Introdução

A anemia aplástica (AA) caracteriza-se por pancitopenia periférica e aplasia da medula óssea, que apresenta hipocelularidade sem ocorrência de infiltração. Os doentes com anemia aplástica frequentemente apresentam sintomas relacionados com anemia, trombocitopenia e leucopenia.

A AA adquirida foi descrita pela primeira vez pelo Dr. Paul Ehrlich em 1888 (1), que reportou um caso de uma mulher grávida, jovem, com pancitopenia muito severa, hemorragias e febres altas sem causa aparente, sintomas aos quais acabou por sucumbir. A autópsia revelou ausência total de medula hematopoiética no fêmur. (2–4)

Até à década de 1970, a maioria dos doentes não resistia à gravidade da doença, sendo a média de sobrevivência de aproximadamente um ano após o diagnóstico. A investigação clínica e laboratorial, a terapêutica imunossupressora e a implementação do transplante de medula óssea contribuíram para a sobrevida destes doentes, bem como para o esclarecimento da patofisiologia da aplasia medular e da biologia das células estaminais hematopoiéticas. (4)

A AA é hoje considerada como o paradigma das síndromes caracterizadas por falha total na hematopoiese medular (5), pela sua longa história na Medicina, e pela sua aparente simplicidade ao caracterizar-se apenas por uma medula óssea hipocelular. (6)

O termo aplasia medular engloba um grupo de patologias heterogêneas entre si, ainda que todas caracterizadas por falha medular, designadas, por isso, de síndromes de falha medular. Estas patologias manifestam-se através de uma bicitopenia ou tricitopenia – anemia, granulocitopenia e/ou trombocitopenia – causadas por aplasia hematopoiética da medula óssea. (7) Assim, caracterizam-se por uma medula óssea incapaz de produzir células sanguíneas circulantes em número adequado, podendo esta incapacidade ser quantitativa e/ou qualitativa e envolver algumas ou todas as linhagens celulares hematopoiéticas. (4,8)

A AA é uma doença hematológica rara, potencialmente fatal, que se caracteriza pela coexistência de pancitopenia periférica grave, persistente e inexplicável, marcada hipocelularidade da medula óssea e ausência de sinais de mielodisplasia ou malignidade. (9) Esta patologia é ainda caracterizada por falha completa na produção e diferenciação de células estaminais e/ou células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea, resultado de lesões no microambiente celular hematopoiético e alteração da adipogénese medular. Observa-se a redução drástica das linhas celulares hematopoiéticas estaminais, ocorrendo a sua substituição por tecido adiposo. (9)

Tabela 1 - Causas de anemia aplástica

Adquiridas	Hereditárias
<i>Idiopática</i>	Anemia de Fanconi
	Disqueratose congênita
Secundária a:	
Radiação ionizante	Síndrome de Schwachman-Diamond
Xenobióticos: busulfan, cloranfenicol, ciclofosfamida, sulfonamidas, benzeno, solventes orgânicos, entre outros.	Síndrome de Blackfan-Diamond
Vírus: Epstein-Barr, Parvovírus B19, da hepatite (não-A, não-B, não-C), HIV-1	Trombocitopenia amegacariocítica congênita
Gravidez	Outras formas congênitas
Desordem autoimune: fascite eosinofílica, hiperimunoglobulinemia, lúpus eritematoso sistêmico, doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro	

HIV; vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency vírus*)

A tabela 1 sumariza as causas mais frequentes de AA. (9–11) A causa mais comum de AA é a adquirida, constituindo a AA adquirida idiopática mais de 80% dos casos na globalidade. (7) A AA adquirida pode ser idiopática e, eventualmente, multifatorial, podendo num mesmo indivíduo coexistirem várias causas associadas. (10,12) No caso de ser possível identificar com precisão uma causa, a AA adquirida pode classificar-se de acordo com esta (tabela 1). Um dos mecanismos fisiopatológicos propostos para a AA adquirida tem como base uma resposta imune exacerbada, mediada por linfócitos T, dirigida às células estaminais hematopoiéticas da medula óssea. (6)

## Epidemiologia e severidade

A AA adquirida apesar de pouco frequente, tem sido objeto de estudo epidemiológico constante. A ausência de identificação de causa em algumas situações, bem como a ligação que se foi estabelecendo a fatores ambientais ou ocupacionais, tornou a etiologia desta anemia foco de investigação. (13) Assim, os estudos epidemiológicos têm como principal propósito verificar se existe alguma predisposição a nível genético para a doença, avaliar fatores externos como possíveis fatores de risco de associação à AA adquirida, e ainda formular hipóteses mais concretas quanto à sua patogénese. (3)

## Incidência por área geográfica

De acordo com o *International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study* (IAAAS), um estudo conduzido em vários países da Europa entre julho de 1980 e dezembro de 2003, no âmbito do qual se confirmou o diagnóstico de AA em 235 casos, a incidência total da AA adquirida moderada a muito severa era de 2,34/milhão de habitantes por ano. (14)

Contudo, estes números são duas a três vezes superiores no continente asiático. (8–11) Na área metropolitana de Bangkok, Tailândia, estima-se que a AA adquirida atinja 3,9/milhão de habitantes por ano (15); enquanto na China é referida uma incidência de 7,4/milhão de habitantes por ano. (17) Esta desproporção face à incidência verificada na Europa pode dever-se a diferenças na exposição da população a fatores ambientais (nomeadamente exposição a toxinas, fármacos, agentes infecciosos, entre outros) e no *background* genético. (14)

## Incidência por género e faixa etária

Os estudos mais recentes apontam para uma incidência em proporções semelhantes para o género feminino e para o masculino. (8-10)

A prevalência de AA adquirida muito severa é maior em crianças e adolescentes dos 2 aos 14 anos, e em adultos dos 45 aos 64 anos, aumentando, de uma forma geral, com o avançar da idade. A média de idades dos doentes diagnosticados no âmbito do IAAAS, que abrangia indivíduos entre os 2 e os 90 anos de idade, era de 53 anos. (14)

## Morbilidade e mortalidade

Os primeiros casos, reportados entre fins do século XIX e as primeiras décadas do século XX, eram universalmente fatais: os doentes sucumbiam a paragem cardíaca, hemorragias internas e infeções generalizadas. (13)

A introdução a partir da década de 1970 dos tratamentos atualmente adotados, quer de suporte, quer específicos, permitiu aumentar a sobrevida do doente; na década de 1990, a

taxa de mortalidade a 2 anos tinha sido reduzida para 41,3%. A taxa de mortalidade revelase superior nos doentes com mais de 45 anos de idade. De acordo com o IAAAS, 5 anos após o diagnóstico de AA, a taxa de sobrevivência dos doentes diagnosticados entre 1980 e 1999 era de 57%, sendo este valor superior para os doentes submetidos com sucesso a transplante de medula óssea. Ainda tendo em conta o mesmo estudo, os doentes que faleceram nos primeiros 2 anos após o diagnóstico apresentavam uma média de idades de 63,5 anos. (14)

### Critérios de definição da severidade da doença

Os critérios utilizados na definição da severidade de AA adquirida baseiam-se naqueles definidos por Bruce Camitta em 1976. Assim, considera-se que um doente sofre de anemia aplástica adquirida severa se possui uma contagem de neutrófilos inferior a  $0,5 \times 10^9$  células/L, uma contagem de plaquetas inferior a  $20 \times 10^9$  células/L, uma contagem de reticulócitos inferior a 1%, e apresenta uma biópsia da medula óssea marcadamente hipocelular, reveladora de uma celularidade inferior a 25%. (4,13)

## Etiologia e Fisiopatologia

A AA adquirida caracteriza-se por redução intensa ou total ausência de hematopoiese medular. Como tal, ocorre diminuição drástica das três linhagens celulares a nível periférico, registando-se anemia, trombocitopenia e granulocitopenia. Manifestações como fadiga crónica, intensa e inexplicada, dispneia, arritmias, palidez das membranas mucosas, petéquias, equimoses, púrpura, e um aumento da suscetibilidade a infeções potencialmente ameaçadoras são relativamente comuns.

Em termos de precursores celulares, a medula óssea é constituída por células estaminais hematopoiéticas, células progenitoras hematopoiéticas, precursores de células mesenquimais e angioblastos, células precursoras do endotélio vascular. No decorrer da aplasia medular, ocorre substituição destas células por adipócitos, linfócitos T CD8+ e mastócitos, gerando uma medula progressivamente hipocelular.

Três fatores são considerados como possíveis responsáveis pela ocorrência de hipoplasia e aplasia medular: produção de autoanticorpos contra as células estaminais hematopoiéticas, falha quantitativa e/ou qualitativa nas células hematopoiéticas estaminais e nas progenitoras, e ainda inibição da diferenciação celular por falta de suporte por parte das células mesenquimais, produtoras de citocinas importantes para o processo hematopoiético. (20)

## Mecanismos fisiopatológicos propostos

A maior parte dos casos de AA adquirida pode ser definida fisiopatologicamente como sendo um processo imunomediado. Este tem como protagonistas os linfócitos T citotóxicos oligoclonais, anormalmente ativados para produzir uma resposta do tipo *T-helper* (Th)<sub>1</sub> (6,21) autoreativa e dirigida contra as células progenitoras hematopoiéticas. (22) Esta resposta cursa com a produção, pelas células dendríticas (DC; *dendritic cells*), linfócitos T e células do mesênquima medular, de citocinas, nomeadamente interferão (IFN)- $\gamma$ , fator de necrose tumoral (TNF; *tumor necrosis factor*)- $\alpha$ , interleucina (IL)-2, IL-12, IL-23 e IL-27. Estas citocinas são inibidoras da atividade das células estaminais hematopoiéticas e da hematopoiese medular (16,21,23,24), e para a redução desta última contribui ainda a diminuição da atividade das células T reguladoras (Treg). (22) De facto, nos doentes com AA adquirida, as células Treg não só estão em número reduzido como são ainda disfuncionais, apresentando um perfil de citocinas alterado. Além disso, observa-se um aumento no número e na atividade das células Th<sub>17</sub> pro-inflamatórias. (8) Grande parte das citocinas supracitadas pertence à família de interleucinas IL-12, responsáveis pela mediação da resposta por parte das células T e promoção da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A produção de IFN- $\gamma$ , crucial na indução da resposta Th<sub>1</sub>, requer IL-12; a IL-23, ao estimular as células



Th17, induz a produção de TNF- $\alpha$  e IL-17; a IL-27 ativa as vias de sinalização JAK/STAT (*janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) e p38 MAPK/T-bet (*mitogen-activated protein kinase/T-bet-dependent*) o que resulta na ativação das células T. Esta ativação orienta para uma resposta Th1 com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . (21,24–26) A caracterização imunofenotípica das células T e a produção exacerbada de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e das interleucinas referidas sugerem que este tipo de resposta é do tipo imune. (6)

Uma resposta oligoclonal do tipo Th1 apoia a hipótese de um estímulo antigénico estar na base do mecanismo fisiopatológico da AA adquirida. Há vários antígenos exógenos que podem causar este tipo de resposta; acresce ainda que as células T citotóxicas são capazes de reconhecer antígenos do próprio. O facto de um fator de exposição – farmacológico, infeccioso, entre outros – comum a uma população dar origem a uma baixa incidência da doença sugere que há fatores genéticos que determinam a resposta imune a estes fatores de exposição. Polimorfismos em genes que codificam antígenos de histocompatibilidade e citocinas, bem como polimorfismos em genes reguladores da função efetora das células T, parecem determinar se a resposta imune a um determinado estímulo antigénico será fisiologicamente normal ou resultará num processo autoimune exacerbado. (3)

### Apoptose pela via Fas/Fas-L

As citocinas anteriormente referidas podem desencadear a morte celular dos progenitores hematopoiéticos medulares CD34<sup>+</sup> através da via celular Fas/Fas-L (*Fas ligand*), transdutora de sinais pró-apoptóticos. (27) De facto, na AA adquirida a percentagem de células CD34<sup>+</sup> está muito reduzida comparativamente à percentagem observada na medula óssea saudável, atingindo valores médios de 0,5%. (3) A proteína Fas é expressa na superfície de linfócitos T ativados, linfócitos B, monócitos e granulócitos, regulando a proliferação destas células e a ação citotóxica das células T, desde que estimuladas por um antígeno, passando assim a expressar o respetivo ligando. Nas células alvo, o ligando Fas-L liga-se ao recetor Fas desencadeando o início da morte celular. (27) As células CD34<sup>+</sup> dos doentes com AA adquirida encontram-se particularmente sensibilizadas a este mecanismo de morte celular, face às mesmas células de indivíduos saudáveis. Níveis de expressão aumentados de Fas parecem relacionar-se com o grau de severidade da doença, sendo que a expressão de Fas na medula óssea de indivíduos saudáveis é muito reduzida. (27) Acresce que o aumento da concentração de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  parece promover de forma proporcional a expressão de Fas. (28–30) Esta expressão encontra-se significativamente aumentada em doentes com diagnóstico recente de AA adquirida, quer nas células T CD8<sup>+</sup>, quer nos precursores CD34<sup>+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> e glicoforina A<sup>+</sup>, desempenhando um papel crucial na apoptose de células hematopoiéticas – nomeadamente das CD34<sup>+</sup>, o alvo principal da resposta autoimune. Nos doentes com AA adquirida, as células T CD8<sup>+</sup> expressam níveis de

Fas-L à sua superfície superiores aos habituais, sugerindo que as células T citotóxicas têm um papel importante na indução da morte celular na medula óssea hematopoiética. (27)

Assim, as vias celulares Fas/Fas-L e as desencadeadas pelo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são inibidoras da hematopoiese e capazes de destruir os progenitores hematopoiéticos já existentes. O número de progenitores hematopoiéticos diminui e estas células estão cada vez mais suscetíveis à ação do IFN- $\gamma$  e do TNF- $\alpha$ , cuja produção pelos linfócitos T persiste aumentada na medula óssea destes doentes. (29)

A interação entre o TNF- $\alpha$  e o respetivo recetor (TNFR) está envolvida na supressão e disfunção da hematopoiese característica da AA adquirida mesmo logo nas fases iniciais da doença. De facto, nestes doentes, há um aumento dos níveis de expressão do TNFR em células CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> e CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>. De notar que as células CD34<sup>+</sup> incluem uma população celular muito heterogénea no que toca ao seu estado de diferenciação, sendo que a sua maioria se trata de células já associadas a uma linhagem hematopoiética específica, isto é, mais diferenciadas, e apenas uma minoria muito restrita destas células incluem células progenitoras hematopoiéticas. (3) A inibição da diferenciação eritroide, habitualmente regulada pela eritropoietina (EPO), conduz assim a uma diminuição na produção de eritrócitos e a uma diminuição da concentração da hemoglobina (Hb). (30)

### Mecanismos de imunidade inata

A imunidade inata também parece desempenhar um papel importante na patogénese da AA adquirida. Nos doentes com esta patologia, ocorre diminuição na produção de monócitos e células *natural killer* (NK), o que resulta no aumento da suscetibilidade a infeções. As células associadas à imunidade inata continuam a produzir IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as principais citocinas envolvidas na patogénese da AA adquirida, e T-bet (*T-box expressed in T cells*), um fator de transcrição Th1. As DC, cuja proliferação aumenta, ativam as células T, nas quais se observa um aumento da expressão de T-bet (20)

### Aspetos genéticos predisponentes e antigénios envolvidos

A componente genética influencia a resposta imune, bem como os efeitos desta resposta no sistema hematopoiético. Com efeito, verifica-se um aumento da predisposição ao aparecimento de AA adquirida em doentes com níveis de expressão superiores de antígeno leucocitário humano (HLA; *human leukocyte antigen*) DR2, molécula integrante do complexo maior de histocompatibilidade (MHC; *major histocompatibility complex*) II, nas células T. (31,32) Nestes doentes, estes linfócitos causam morte celular das células estaminais hematopoiéticas através da via FasL/Fas, atuando através do HLA DR. (32–34)

A expressão de Fas e HLA DR na linhagem hematopoiética aumenta progressivamente ao longo das diferentes fases de diferenciação celular. As células CD34+ na medula óssea que são progenitores iniciais são menos de 10%, sendo a maior percentagem dessas células as células mais diferenciadas. (32)

Observa-se ainda que polimorfismos em regiões regulatórias de genes codificantes de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , se associam com aumento da expressão dessas citocinas. (8,35)

A deficiente homeostase dos telômeros é uma característica da AA adquirida, pelo menos em alguns casos. De facto, há uma ligação molecular e fisiopatológica estabelecida entre defeitos na reparação dos telômeros e a AA adquirida, que se pensa ser ainda a causa da evolução clonal para quadros de síndrome mielodisplásico (MDS) e leucemia mieloide aguda (LMA), e de recidivas após terapia imunossupressora. O que se observa é uma deficiência na telomerase, que afeta não só a medula óssea, mas também o fígado e os pulmões. A causa desta deficiência parece associar-se com mutações, nomeadamente *single nucleotide polymorphisms* (SNP), nos genes codificantes da telomerase ou das proteínas que com ela interagem (*telomerase-binding proteins*), mais frequentemente nos genes *TERT* ou *TERC*. A presença destas mutações em doentes sem história familiar apoia a associação destas mutações com AA na sua forma adquirida, e não só com a AA congénita ou hereditária. (36–38) Estas mutações levam à diminuição da atividade da telomerase e aumento da degradação dos telômeros. Nas células estaminais hematopoiéticas da medula óssea, a manutenção dos telômeros é garantida pela telomerase, que evita a sua degradação natural ao longo de mitoses sucessivas. Ao degradarem-se os telômeros, aumenta-se para o dobro a probabilidade de ocorrer a recidiva da doença após o doente ter sido submetido a tratamento; quando esta degradação já é extensa, é grande a probabilidade de que venha ocorrer evolução clonal. (37,38)

Estudos realizados com culturas celulares demonstraram a instabilidade genómica causada pela ausência de telômeros em cromossomas de células da medula óssea de doentes com mutações nos genes *TERT* e *TERC*. (38) No Hospital Saint George, em Londres, em 2006, um terço dos doentes com síndromes de falha na medula óssea apresentavam diminuição no comprimento dos telômeros, nalguns casos associados a mutações num ou mais deste conjunto de genes: *TERT*, *TERC*, *DKC1*, *NOP10* e/ou *TINF2*. (38,39) Estas mutações, em conjunto com fatores ambientais e epigenéticos, contribuem para uma diminuição da capacidade proliferativa dos progenitores hematopoiéticos da medula óssea, e podem associar-se com baixa capacidade de resposta à terapêutica imunossupressora e maior probabilidade de recidiva da doença. Assim, o aparecimento dos sintomas, e a severidade dos mesmos, pode ser condicionado em parte pela biologia dos telômeros e respetiva

manutenção pela telomerase. Ainda que não sejam, na maioria dos casos, suficientemente patológicas, as mutações nos genes associados à telomerase parecem predispor a medula óssea a uma maior sensibilidade a estímulos antigénicos, o que pode ser o ponto de partida para o desencadear de AA adquirida. Nos doentes em que estas mutações sejam um fator fisiopatológico importante, o transplante de células estaminais hematopoiéticas é a única potencial cura. (38)

Importa ter em conta que existem mutações que determinam uma total perda de função dos genes, enquanto outras se tratam apenas de polimorfismos quase impercetíveis. (8,35)

### Outros aspetos da imunidade adquirida

A AA adquirida é predominantemente caracterizada por uma resposta celular exacerbada e autodirigida das células T, mas em muitos doentes deteta-se a presença de autoanticorpos. São de destacar os anticorpos anti-moesina, uma proteína de interação com o citoesqueleto. A presença destes autoanticorpos sugere que a resposta humoral poderá coexistir com a resposta celular na fisiopatologia desta anemia. (21,40,41)

### Papel imunológico das células mesenquimais

As células mesenquimais são células multipotentes com capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares, tais como células ósseas, células musculares e células do tecido adiposo. Estas células secretam fatores bioquímicos que controlam e modificam o microambiente hematopoiético, desempenhando um papel importante na diferenciação, proliferação e maturação das células hematopoiéticas.

As células mesenquimais possuem ainda função imunomodulatória. Neste sentido, quando na presença de células T *naïve*, as células mesenquimais inibem a sua proliferação por ação de estímulos mitóticos, incluindo aqueles induzidos por células apresentadoras de antígenos, exceto quando expostas a IFN- $\gamma$ . Neste caso, ocorre uma estimulação da expressão de MHC da classe II. As células mesenquimais têm ainda a capacidade de inibir a expressão de MHC da classe I e II e respetivas moléculas coestimulatórias (42–46), inibindo a maturação das DC, tornando-as incapazes de ativar a resposta das células T. Isto resulta numa resposta das células T direcionada não para uma resposta do tipo Th1, mas sim do tipo Th2. (46,47)

Atuando ao nível da imunidade inata, as células mesenquimais inibem as células T CD4+ e CD8+ (48), a ação citotóxica das células NK e a sobrevivência dos neutrófilos. (42,46)

As células mesenquimais, que constituem o microambiente não-hematopoiético, têm como atividade reconhecida o facto de suportarem o crescimento e diferenciação das células

progenitoras hematopoiéticas, possuindo ainda capacidade imunorreguladora e de se expandirem rapidamente *in vitro*. (48–52) Em particular, as células CD146+ são necessárias à manutenção do microambiente hematopoiético. (53) É-lhes reconhecida a capacidade de produzirem fatores de imunossupressão: prostaglandina-E2, *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ), IL-10 e a isoforma HLA-G5, sendo esta inibidora da proliferação das células T *naïve*. (46,51,54,55) No entanto, a medula óssea hipoplástica ou aplástica caracteriza-se por diminuição da proliferação e diferenciação das suas células, bem como da sua capacidade de inibir a ativação, proliferação e libertação de citocinas pro-inflamatórias pelas células T. (49,50)

### Fatores etiológicos possíveis

A ativação dos linfócitos T é causada por estímulos antigénicos endógenos ou exógenos, muitas vezes desconhecidos. (28) Esta resposta imune desregulada pode, no entanto, ser desencadeada por inúmeras causas, tendo sido já reportados casos de exposição a tóxicos (pesticidas, arsénico, benzeno), radiação (em contexto de tratamento oncológico ou não), agentes infecciosos, como os vírus da hepatite, citomegalovírus, parvovírus B19, vírus da imunodeficiência humana, fármacos (como anteriormente referido), ou ainda no decorrer do tratamento de algumas doenças autoimunes. (56) Entre os 235 casos reportados no IAAAS, em 20,8% tinha ocorrido exposição a fármacos e em 8,9% a agentes ambientais tóxicos, como inseticidas, benzeno e outros solventes. (14)

O benzeno apresenta elevada toxicidade para a medula óssea. Estudos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais relacionam a exposição ao benzeno com aplasia medular, leucemias agudas e outras doenças hematológicas. Por estes e outros potenciais fatores etiológicos, é importante conhecer a atividade profissional presente e passada do doente. (57)

De acordo com alguns estudos, parece haver um risco acrescido de desenvolvimento de AA para xenobióticos como anti-inflamatórios não esteroides (indometacina, naproxeno), corticosteroides, penicilaminas, sulfonamidas, alopurinol (14,19), anticonvulsivantes (fenitoína), agentes hipoglicemiantes (tolbutamida) e agentes antimaláricos (cloroquina). (7,14,19)

Muitos agentes quimioterápicos – agentes alquilantes, antimetabolitos, antimitóticos - e alguns antibióticos causam supressão da atividade medular. Por norma, os seus efeitos são proporcionais à dose administrada, mas podem também ocorrer reações idiossincráticas a outros fármacos, sem que haja uma relação clara com a dose administrada ou com o mecanismo de ação e efeitos secundários conhecidos. No entanto, apesar de

individualmente terem efeitos devastadores na qualidade de vida dos doentes, estas reações ocorrem muito raramente. (57)

Em caso de suspeita de aplasia medular induzida por fármacos, a terapêutica em questão deve ser interrompida definitivamente e evitada ao máximo a exposição à mesma no futuro. (7)

Entre os agentes infecciosos, os vírus da hepatite são os mais frequentes. A aplasia medular pós-hepatite é habitualmente muito grave e constitui cerca de 5% dos casos.

A aplasia medular pode ser ainda consequência da doença do enxerto *versus* hospedeiro (GVHD, *graft versus host disease*) e está também associada a outras doenças autoimunes, como a fascite eosinofílica e o lúpus eritematoso sistémico. (57)

A associação à hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é também frequentemente observada, tendo o primeiro doente com este quadro clínico sido reportado em 1944. (3) Na HPN ocorre mutação no gene *PIG-A*, codificante de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que está presente na superfície das células estaminais hematopoiéticas. A ausência de GPI está na base do quadro de hemólise intravascular, trombofilia e citopenias, muitas vezes até de pancitopenia, que caracteriza a doença. A HPN é uma anemia hemolítica crónica adquirida, em que a hemoglobinúria noturna é comum, e frequentemente associada a neutropenia e/ou trombocitopenia e episódios de trombose venosa. (58) Em 22% dos doentes, a pancitopenia, moderada a severa, desenvolve-se no decorrer da HPN. O contrário também se pode observar, doentes diagnosticados com anemia aplástica adquirida podem vir a desenvolver HPN. Esta patologia pode ainda ser consequência dos efeitos secundários da terapia imunossupressora, a que os doentes com AA adquirida são frequentemente submetidos. (3)

A AA adquirida, ainda que seja uma doença que, pela sua prevalência, seja considerada rara, o facto de estar fortemente associada à exposição a xenobióticos de uso relativamente comum, tem algum impacto em termos de saúde pública. (6)

## Estudo clínico e laboratorial

### Exame físico e historial clínico do doente

A aplasia medular não apresenta sintomas e sinais específicos, sendo estes por vezes semelhantes aos de outras doenças do foro hemato-oncológico e proporcionais ao grau de pancitopenia apresentada. (3)

O início da anemia aplástica adquirida pode ser abrupto ou gradual. As manifestações mais comuns derivam da trombocitopenia existente e relacionam-se com hemorragias, nomeadamente das gengivas e do nariz, forte fluxo menstrual nas mulheres, hematomas e petéquias. Numa fase posterior da doença, pequenas hemorragias no sistema nervoso central podem originar hemorragia intracraniana.

Sintomas e sinais característicos de anemia também podem ser observados, nomeadamente ataxia, insuficiência respiratória, tonturas, cefaleias, palidez da pele e membranas mucosas, entre outros. O aparecimento de infeções recorrentes não é comum nas primeiras fases da doença, sendo resultado da neutropenia ou granulocitopenia que se desenvolve posteriormente. (57) Assim, e como resultado de infeções “oportunistas”, podem ocorrer úlceras na cavidade orofaríngea, gengivite necrotizante, pneumonia, entre outras, numa fase posterior da doença. (3,7)

Uma característica surpreendente da aplasia medular é o facto de, muitas vezes, os sintomas se restringirem ao sistema hematopoético, não interferindo muito com a qualidade de vida do doente – este aparenta sentir-se bem, apesar da marcada pancitopenia, sendo frequentemente diagnosticado durante exames médicos de rotina. A doença pode prolongar-se durante anos sem que seja alvo de atenção médica. Contudo, noutros doentes os sintomas podem desenvolver-se de forma abrupta e imprevisível. (3,57)

Outros sinais devem ser tidos em conta, no sentido de excluir a hipótese de estar perante uma forma congénita ou hereditária de AA, como pigmentação atípica da pele, distrofias nos dedos e unhas das mãos e dos pés, disqueratoses, e ainda sinais de fibrose pulmonar ou cirrose hepática. Outros sinais que afastam a hipótese de AA adquirida são linfadenopatias, hepatomegalia e esplenomegalia (7), o que reforça a importância do diagnóstico diferencial imagiológico.

### Avaliação laboratorial e imagiológica

O diagnóstico tem por base a deteção de citopenias, que muitas vezes se traduz em pancitopenia, e observação da redução da celularidade hematopoética da medula óssea, persistente e inexplicável, com substituição do tecido hematopoético por tecido adiposo e

sem sinais de displasia ou fibrose medular. (9,59) Para estabelecer o diagnóstico, importa excluir outras patologias com sinais ou sintomas semelhantes; importa ainda avaliar a severidade e o prognóstico da doença.

Assim, é crucial no processo de diagnóstico de AA adquirida: (i) confirmar com exatidão o diagnóstico; (ii) realizando diagnóstico diferencial; (iii) caracterizar o doente, nomeadamente quanto à severidade da patologia, prognóstico e resposta ao tratamento e, se possível, identificar o fator/agente etiológico na base da doença. (9,10,60) Deve ser tido em consideração que o diagnóstico da AA adquirida é um diagnóstico de exclusão, não existindo nenhum exame imagiológico ou laboratorial que permita, por si só, um diagnóstico definitivo e confiável. Como tal, o diagnóstico diferencial deve contemplar todos os quadros alternativos de falha da medula óssea. (60)

Neste sentido, para além da história clínica individual e familiar e do exame físico do doente, o diagnóstico da AA adquirida implica a realização de vários exames considerados fundamentais para o correto diagnóstico, sejam eles laboratoriais ou imagiológicos.

### Estudo do sangue periférico

Sendo a pancitopenia a principal característica hematológica, é fundamental proceder-se à contagem total e diferencial de células sanguíneas e, como tal, à realização do hemograma completo. A anemia normocrômica normocítica, ou eventualmente macrocítica, observada é geralmente acompanhada de trombocitopenia na fase inicial da doença, surgindo posteriormente neutropenia. Assim, verifica-se habitualmente a evolução de mono ou bicitopenia para uma pancitopenia. A contagem de reticulócitos encontra-se tipicamente reduzida.

O exame do esfregaço do sangue periférico é essencial para excluir a presença de blastos e células displásicas, o que pode auxiliar a excluir a possibilidade de se tratar de síndrome mielodisplásica ou leucemia hipocelular. Perante uma monocitopenia, é importante pesquisar no esfregaço tricoleucócitos, cuja presença se associa com leucemia de células em cabelo. (9,10,60) É comum observar-se no exame do esfregaço de sangue periférico uma ligeira macrocitose e eventual presença de granulações tóxicas nos neutrófilos. (60)

### Estudo da medula óssea

O estudo da medula óssea deve envolver a avaliação do aspirado e de uma biópsia sólida, uma vez que enquanto o aspirado fornece informações mais precisas sobre a morfologia celular individual, a biópsia permite avaliar a celularidade no seu todo e a distribuição da população hematopoiética. (9,10)

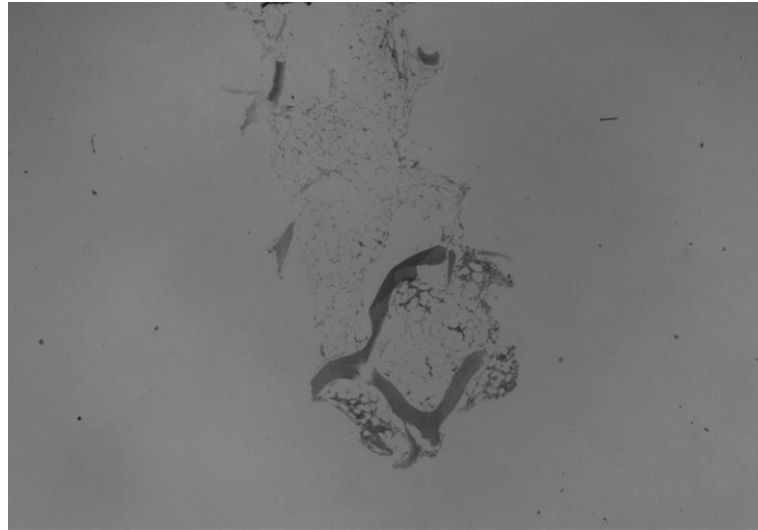


Para efeitos de diagnóstico diferencial, devem ainda ser efetuados estudos a nível citogenético, estudos de imunofenotipagem, bem como realizar-se coloração de Perls. (10) De notar que algumas anomalias citogenéticas podem ser transitórias no decurso da doença ou do respetivo tratamento. (9)

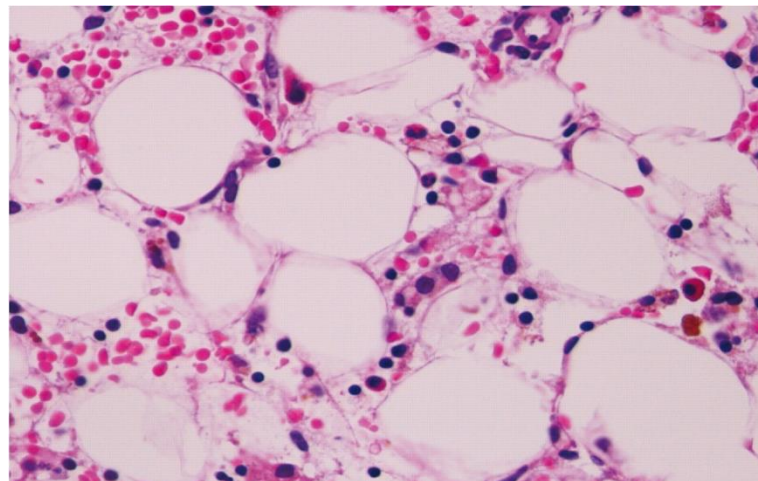
Em doentes com AA, a medula é claramente hipocelular, com grande predomínio de adipócitos, linfócitos e mastócitos e praticamente ausência de células CD34+ e CD117+. (9,10) A percentagem de células CD34+ na AA adquirida é normalmente inferior a 0,1%, enquanto nas mielodisplasias hipocelulares pode atingir valores de 0,5-1%. (4,61) Observa-se ainda um número residual de células hematopoiéticas. A hematopoiese está, no geral, bastante comprometida, sendo a diseritropoiese comum, uma característica partilhada com as mielodisplasias, e quando coexistem HPN e AA adquirida. (4,60)

A celularidade hematopoiética medular deve, na generalidade dos casos, ser inferior a 30% para estabelecer um diagnóstico de AA (figura 1), ainda que o valor de *cut-off* seja diferente para a população idosa, já que a hematopoiese se encontra fisiologicamente diminuída em idades mais avançadas. (9) Além disso, o estudo da biópsia permite excluir a presença de infiltrados celulares atípicos, nomeadamente metástases. (9) Nos doentes com AA, as biópsias são geralmente hipocelulares ao longo de toda a amostra, ainda que se possam observar focos de hematopoiese (figura 2); podem observar-se agregados de linfócitos, particularmente na fase aguda da doença ou se esta está associada a uma patologia autoimune sistémica. (60) Ocorre ainda substituição do tecido hematopoiético por tecido adiposo. A exclusão da presença de blastos e células displásicas permite excluir diagnósticos de leucemia hipocelular e síndrome mielodisplásico (SMD). (10,62)

De referir que a interpretação histopatológica da biópsia e do aspirado da medula óssea deve ser feita à luz da história clínica individual e familiar, dos valores obtidos para os parâmetros hematológicos e bioquímicos estudados, e dos métodos de diagnóstico diferencial usados, como o estudo citogenético, a pesquisa de agentes infecciosos e autoanticorpos, entre outros. (8,63)



*Figura 1. Fragmento de medula óssea hipocelular, 5% de celularidade hematopoiética (ampliação de 100x)). Podem observar-se focos de hematopoiese ocasionais; os espaços “vazios” são preenchidos por adipócitos, macrófagos, linfócitos e mastócitos. (8)*



*Figura 2. Secção de corte histológico de medula óssea hipocelular e em que ainda se observam focos de eritropoiese. (Coloração hematoxilina e eosina (H&E); ampliação 400x.) (63)*

### Estudo imagiológico

O estudo imagiológico também tem o intuito de efetuar o diagnóstico diferencial, e deve incluir ecografia abdominal, ecocardiograma, tomografia computadorizada à zona torácica e testes de função pulmonar.

### Critérios de diagnóstico e severidade

Atualmente, a aplasia medular é classificada como moderada, severa ou muito severa (tabela 2), tendo em conta a classificação de Bruce Cammita. (18)

Tabela 2. Critérios de definição da severidade da aplasia medular

Moderada	Severa	Muito Severa
Celularidade hematopoiética da medula óssea <30%		
Hemoglobina < 10g/dL		
Neutrófilos < $1,0 \times 10^9/L$ e > $0,5 \times 10^9/L$	Neutrófilos < $0,5 \times 10^9/L$ e > $0,2 \times 10^9/L$	Neutrófilos < $0,2 \times 10^9/L$
	Plaquetas < $20 \times 10^9/L$	
	Reticulócitos < $20 \times 10^9/L$	

Adaptado de Young, 2002; Rovó et al., 2013; Cammita, 1976 (6,9,18)

Em doentes com aplasia medular, observa-se um aumento ao nível da medula óssea das células T citotóxicas (T CD8+), que, geralmente, diminuem caso a terapia imunossupressora tenha sucesso. O perfil de citocinas apoia uma resposta oligoclonal imune do tipo Th1, verificando-se um aumento de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas induzem um aumento da expressão de Fas nas células CD34+, levando a uma maior suscetibilidade à morte celular por apoptose. (57,64,65)

## Diagnóstico diferencial

Como já referido, apesar do diagnóstico da AA adquirida se guiar por critérios muito exigentes e envolver uma série de meios complementares de diagnóstico, será sempre um diagnóstico de exclusão. Consequentemente, o algoritmo de diagnóstico tem vindo a tornar-se progressivamente mais detalhado, no sentido de excluir com certeza patologias que apresentam similaridades clínicas. (66) A exclusão de outras patologias, nomeadamente congénitas, é crucial, dado que o tratamento é diferente. (59)

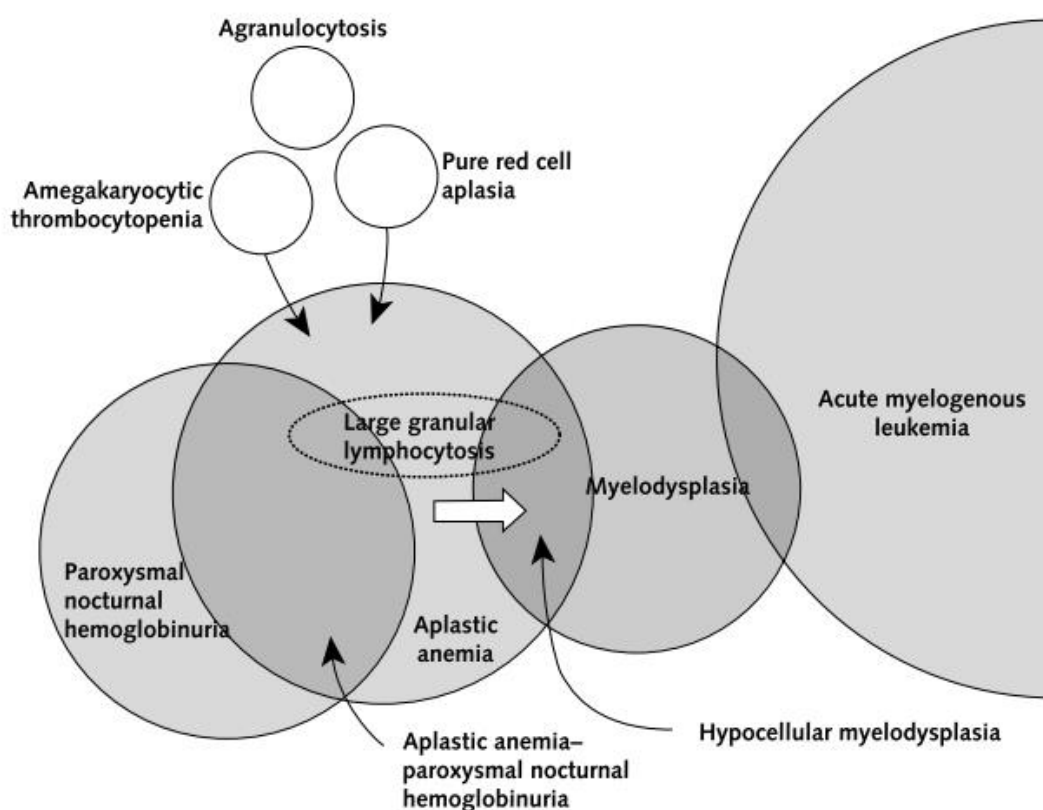


Figura 3. Diagrama representativo da sobreposição de características clínicas e fisiopatológicas da anemia aplástica e de outras patologias hematológicas. (6)

Entre as patologias a excluir para estabelecer o diagnóstico preciso de AA adquirida, encontram-se formas hipoplásticas de neoplasias do foro hemato-oncológico e formas hereditárias de aplasia medular. Alguns exemplos são a leucemia aguda hipoplástica, síndromes mielodisplásicas, leucemia de células em cabelo, linfomas, metastização por outros tumores da medula óssea, osteomielofibrose, anemia megaloblástica severa, doenças autoimunes sistêmicas, anemia de Fanconi e a síndrome de Schwachman-Diamond. (7,67)

#### Exclusão de formas congénitas de aplasia medular e de HPN

As formas congénitas ou hereditárias de aplasia medular, apesar de serem raras, têm sido úteis na medida em que é possível estabelecer um paralelismo face às formas adquiridas, de carácter mais complexo e também mais comuns. (8)

Apesar de ser mais frequente a apresentação de sintomas nas formas congénitas de aplasia medular nas crianças e jovens, também pode ocorrer no adulto. As formas congénitas constituem cerca de 15 a 20% dos diagnósticos de aplasia medular, o que vem reforçar a importância do diagnóstico diferencial. (10)

As duas formas congénitas mais comuns são a anemia de Fanconi e a disqueratose congénita. (60) A anemia de Fanconi é uma doença genética que afeta o sistema

hematopoiético, e na qual se observa afetação a nível sistémico, com ocorrência de manchas na pele, deformidades nos dedos, escoliose, e manifestações neurológicas e cardíacas. A disqueratose congénita caracteriza-se por apresentar sintomas mucocutâneos, ocorrendo pigmentação anormal da pele, distrofia das unhas e leucoplasia das mucosas. Esta patologia está associada ao encurtamento exagerado dos telómeros por mutações nos genes responsáveis pela respetiva reparação e regeneração, o que leva a uma incapacidade de regeneração da medula óssea e predisposição a neoplasias malignas. (4,8)

No caso da anemia de Fanconi, já foram identificadas mutações em 16 genes, e no caso da disqueratose congénita foram identificadas 10 mutações. As técnicas de biologia molecular e citogenética, nomeadamente a hibridação por fluorescência *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) e a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) *multiplex* (multiplex-qPCR), são particularmente úteis no diagnóstico diferencial da disqueratose congénita. O comprimento dos telómeros, tipicamente curtos nas células hematopoiéticas desta patologia, é um parâmetro importante no seu diagnóstico genético. Também ocorrem frequentemente mutações nos genes codificantes da telomerase. Assim, a pesquisa de mutações nos genes da telomerase poderá permitir excluir um diagnóstico de síndrome de disqueratose congénita, além de permitir prever a resposta à terapêutica imunossupressora. No diagnóstico de anemia de Fanconi, o teste da fragilidade cromossômica dos linfócitos do sangue periférico após exposição ao diepoxibutano é crucial. (9,60) O diagnóstico diferencial da anemia de Fanconi é especialmente importante em doentes com menos de 50 anos de idade e/ou potenciais candidatos a transplante de medula, ainda que pertinente em doentes mais velhos se a apresentação clínica o sugerir. (60)

Outras patologias congénitas que podem ser pesquisadas no âmbito do diagnóstico diferencial são as síndromes de Schwachman-Diamond e Blackfan-Diamond. (9,10) A síndrome de Schwachman-Diamond é uma doença autossómica recessiva caracterizada por falha na medula óssea, insuficiência do pâncreas exócrino e manifestações a nível esquelético. Cerca de 25% dos doentes apresentam pancitopenia, sendo o mais comum apresentarem apenas neutropenia, e grande predisposição de evolução para mielodisplasia, leucemia mieloide aguda ou aplasia medular secundária. Já a síndrome de Blackfan-Diamond, ou aplasia congénita eritroide pura, é uma patologia rara que geralmente se manifesta na infância com os sintomas típicos de anemia. É causada por um decréscimo seletivo nos precursores eritroides da medula óssea, levando a reticulocitopenia periférica e anemia normocrômica macrocítica. Estes doentes apresentam também mais predisposição para sofrer de doenças do foro hemato-oncológico. (8)

A mutação no gene *cMpl* permite ainda excluir um quadro de trombocitopenia amegacariocítica congénita. (9,10)

Tal como anteriormente foi referido, a HPN pode surgir associada a um quadro de aplasia medular. Os doentes que desenvolvem HPN no decurso de um quadro de AA (possuem uma síndrome de associação da aplasia medular à HPN) podem apresentar também deficiência na expressão de GPI nas células do sangue periférico, o que é observado em cerca de 70% dos doentes com AA adquirida, mas sem apresentar sintomas típicos de episódios de hemólise. Apesar de não haver dados epidemiológicos concretos, estima-se que 15 a 20% dos doentes com AA adquirida venha a desenvolver HPN. (3,60,68) Como tal, é fundamental também diferenciar ambas as circunstâncias, na medida em que será extremamente relevante na abordagem efetuada ao doente. De referir que pode ocorrer um aumento dos clones de células deficientes em GPI após imunossupressão, sendo que, então, o doente desenvolve os sintomas típicos da HPN. (9,69) Assim, a citometria de fluxo permite fazer a imunofenotipagem das células do sangue periférico identificando a presença/ausência de GPI à superfície das células, constituindo o *gold standard* no rastreio e diagnóstico da HPN; pode ainda complementar-se este estudo com a pesquisa de mutações no gene *PIG-A*. (9,32,58,60)

Como já referido, o estudo imagiológico contribui para a realização do diagnóstico diferencial, e inclui ecografia abdominal, ecocardiograma, tomografia computadorizada à zona torácica e testes de função pulmonar. Neste sentido, a presença de cirrose hepática, fibrose pulmonar ou insuficiência renal sustenta a presença de uma falha na medula óssea de origem congénita e não idiopática adquirida. (60) Por norma, não se observam linfadenopatias, esplenomegalia ou hepatomegalia. (9)

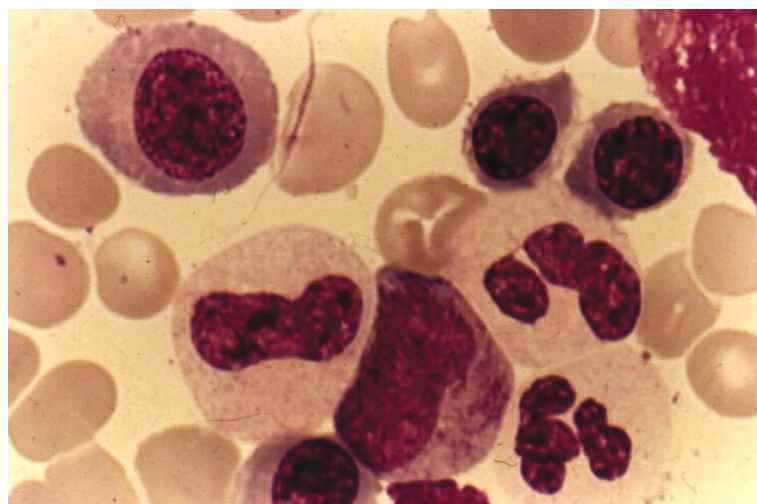
### Exclusão de neoplasias do sistema hematológico

A observação de blastos ou células displásicas no esfregaço do sangue periférico e no aspirado e/ou biópsia da medula óssea sugere a presença de uma patologia do foro hemato-oncológico, nomeadamente mielodisplasia (figura 4) e leucemia hipocelular. (10,12,60,68) Apesar de estas formas oncológicas serem raras, representam 10 a 15% dos doentes com neoplasias mieloides, pelo que, em casos em que a celularidade da medula óssea é muito baixa (inferior a 20%) pode tornar-se muito difícil diferenciar mielodisplasias ou leucemias hipocelulares de AA adquirida. (63,70,71) No caso de se observar monocitopenia na contagem diferencial de células sanguíneas, deve ser excluído um quadro de leucemia das células em cabelo ou deficiência na expressão de GATA2. (60,72) Também devem ser pesquisados infiltrados atípicos, nomeadamente metástases na medula óssea, ou sinais de fibrose medular. (9,10,59).

No entanto, a avaliação unicamente morfológica pode revelar-se especialmente difícil, já que as diferenças observadas entre as referidas patologias podem ser subtis, e a própria identificação das células em alguns casos algo subjetiva. Não só a nível hematopoiético, mas também das células mesenquimais, podem observar-se semelhanças, como por exemplo presença de mastócitos e agregados de linfócitos. No entanto, a presença de agregados de blastos em localização atípica é um bom indicador da presença de mielodisplasia, particularmente de uma forma mais agressiva. A associação da imunohistoquímica à observação morfológica permitiu melhorar o diagnóstico diferencial da AA adquirida, na medida em que os blastos podem ser identificados com recurso a anticorpos contra antígenos conhecidos. (63)

Adicionalmente, a citogenética vem complementar os achados anátomo-patológicos da medula óssea, concretamente, através das técnicas de FISH e citometria de fluxo aplicadas às células do aspirado medular. Neste sentido, a técnica de FISH poderá permitir identificar anomalias cromossômicas nos cromossomas 5,7 e 8, que podem indiciar uma mielodisplasia ou risco de evolução clonal. (8,9,59) Por outro lado, a citometria de fluxo permite identificar populações monoclonais de células B e T, e blastos, sendo estes sobretudo CD34+ e praticamente ausentes na AA adquirida. Ainda assim, cerca de 12% dos doentes apresentam anormalidades citogenéticas transitórias no decurso do tratamento. (9)

A presença de focos de diseritropoiese é comum nos doentes com AA adquirida, pelo que não permite, isoladamente, direcionar o diagnóstico para uma mielodisplasia. (59)



*Figura 4. Aspirado da medula óssea de um doente com mielodisplasia. Podem observar-se precursores eritroides megaloblásticos e granulócitos com ausência de grânulos (Coloração Wright-Giemsa, ampliação 1000x). (63)*

A imunofixação permite identificar as várias populações celulares e excluir a presença de blastos, logo de uma leucemia ou linfoma. Mais concretamente, a presença de células CD34+ ou CD117+ vem afastar a hipótese de AA adquirida. (9) A marcação com anticorpos

específicos para mieloperoxidase, lisozima ou CD68 pode também auxiliar a identificação de blastos e a distinção de outras formas celulares imaturas. (63)

### Exclusão de patologias autoimunes

Cerca de 10% dos doentes com aplasia medular sofrem de uma doença sistêmica de foro autoimune, seja esta de diagnóstico anterior ou posterior ao surgimento da aplasia medular. A incidência de patologias autoimunes aumenta progressivamente com a idade, sendo que a associação com um quadro de aplasia medular se verifica em mais de 25% dos doentes com idade superior a 50 anos. Mais frequentemente, surgem casos de tiroidite ou gastrite associados a aplasia medular. Ainda é, no entanto, controversa a associação do aparecimento de patologias autoimunes com a imunossupressão utilizada no tratamento da aplasia medular.

Ainda assim, o diagnóstico diferencial da AA adquirida deve englobar a exclusão de patologias autoimunes sistêmicas, como o lúpus eritematoso sistêmico. Neste sentido, deve efetuar-se a determinação dos títulos de autoanticorpos nucleares, como são exemplo os anticorpos anti-DNA de cadeia dupla. (9,73)

### Exclusão de outras patologias

As doenças infecciosas, ainda que algumas careçam de mais dados epidemiológicos, são por vezes associadas a quadros de aplasia medular. A associação de hepatite D e E com o desenvolvimento de AA adquirida é relativamente frequente, estimando-se que 5 a 10% dos doentes se encaixem neste quadro. (9,74)

Outros agentes infecciosos devem ser despistados no sentido de excluir um quadro de aplasia medular pós-viral, de carácter mais transitório; são exemplos, para além dos vírus da hepatite D e E, parvovírus B19, vírus Epstein-Barr e citomegalovírus. (10,60)

A exclusão de anemia megaloblástica severa, que é uma anemia rara associada a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e/ou folatos, deve também ser feita através do doseamento dos parâmetros que podem estar em défice, bem como a exclusão de anemia por deficiência em ferro através do doseamento do ferro e ferritina séricos.

## Métodos emergentes de diagnóstico e prognóstico

Os mais recentes avanços na biologia molecular permitiram desmitificar um pouco mais a patofisiologia da AA adquirida. As perturbações de processos celulares fundamentais, como são a regeneração dos telómeros, a formação dos ribossomas e os mecanismos de reparação do DNA, convergem no sentido de conduzir à apoptose das células estaminais hematopoiéticas. O conhecimento da patofisiologia da AA adquirida abre caminho para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e prognóstico. (8)



### Biomarcadores preditivos da evolução do quadro clínico e resposta à terapêutica

Nos últimos anos, a investigação clínica e laboratorial tem-se focado em identificar biomarcadores preditivos de resposta dos doentes com AA adquirida ao tratamento. O que se pretende é auxiliar na tomada de decisões quanto à abordagem clínica do doente. No entanto, ainda não foi aceite ou implementado com sucesso um biomarcador, até porque a validação de um biomarcador no diagnóstico e/ou prognóstico de uma patologia é longo e implica várias fases. (75)

A idade tem-se mostrado um bom fator preditor da resposta ao tratamento, na medida em que os doentes em idades pediátricas apresentam uma boa resposta à terapia imunossupressora em cerca de 70 a 80% dos casos, sendo que esta resposta decresce com a idade, e contrasta com a obtida para os adultos com mais de 50 anos, que é de 50 a 60%. (75–77)

Os parâmetros hematológicos, nomeadamente a contagem absoluta pré-tratamento de reticulócitos e linfócitos, parecem funcionar como fatores preditivos. Os doentes cujos níveis de reticulócitos e linfócitos são mais elevados, nomeadamente superiores a  $25 \times 10^9/L$  para os reticulócitos e a  $10 \times 10^9/L$  para os linfócitos, têm uma resposta ao tratamento superior em 40% àqueles com contagens mais baixas destas células. (60,75,76) Nestes doentes foi reportada também uma correlação positiva entre uma melhor resposta à terapêutica e os níveis de células Treg. (8)

Uma vez que a AA adquirida está associada a uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, os níveis destas, refletindo a fisiopatologia da doença, podem refletir também a evolução clínica dos doentes. (78). Os polimorfismos nos genes que codificam estas citocinas também influenciam os respetivos níveis de expressão, logo, a resposta ao tratamento. (79) De forma inversa, os níveis de trombopoietina apresentam-se mais elevados em doentes com dificuldade em responder ao tratamento, sendo os seus valores relacionáveis com a severidade da doença. (75,80)

Presume-se também que a diminuição no comprimento dos telómeros nas células hematopoiéticas esteja relacionada com o *stress* hematopoiético associado à AA adquirida. (81) A erosão destas estruturas cromossómicas leva à diminuição da capacidade regenerativa do tecido hematopoiético. Apesar de ainda haver alguma controvérsia quanto à relevância deste parâmetro na previsão da resposta e evolução dos doentes, a associação do comprimento dos telómeros com o risco de recidiva e de evolução clonal e com a sobrevida dos doentes já foi demonstrada. (75,82) Os resultados dos estudos realizados em crianças e adultos são contraditórios; estudos realizados em crianças reportaram que os telómeros muito curtos dos granulócitos se relacionavam com pior resposta ao tratamento

com imunossupressores. Este é um parâmetro cuja interpretação pode ser útil, mas dependente da idade. (75,83)

Outros parâmetros que podem auxiliar na predição do risco de evolução clonal, constituindo agravantes do mesmo, incluem: (i) repetição de ciclos de terapia imunossupressora com globulina antitumoral, (ii) idade avançada, (iii) utilização de fatores de crescimento hematopoiéticos em doses elevadas e durante períodos prolongados em simultâneo com a terapia imunossupressora. (37)

Por outro lado, já após o transplante de células estaminais hematopoiéticas da medula óssea, o aparecimento de células hematopoiéticas e respectivas formas mais diferenciadas provenientes do dador podem ser utilizados como fator de previsão da sobrevida dos doentes sem eventos complicativos. Na prática, a identificação das células de ambas as proveniências, do doente e do dador, é possível através de marcadores de DNA polimórfico e PCR. Neste sentido, o aparecimento sucessivo de células provenientes ou derivadas das células do próprio doente (sob a forma de quimerismo completo ou misto) correlaciona-se com uma maior probabilidade de recidiva. (84,85)

Sabe-se que o *stress* hematopoiético se correlaciona com a diminuição do comprimento dos telómeros e consequente instabilidade genómica, o que favorece o aparecimento de mutações somáticas e outras alterações ao nível molecular. (86) A deteção da presença de mutações comuns em neoplasias mieloides permite obter mais informação quanto ao prognóstico e avaliação dos doentes com AA adquirida, podendo ser realizada através do estudo do cariótipo por *SNP array* (SNP-A). A pesquisa destas mutações permite conhecer o risco de evolução clonal, isto é, de transformação para mielodisplasia ou outras neoplasias. (8,9) Outras anomalias citogenéticas, surpreendentemente, podem prever uma boa resposta à terapia imunossupressora – são exemplos a trissomia 8 ou a deleção del(13q). (60)

Outro exemplo são as mutações no gene *BCoR/BCoL1* que, através da sequenciação completa do exoma (*whole genome sequencing*) e *targeted deep sequencing*, podem ser identificadas. (86) Estes genes codificam uma proteína co-repressora da BCL6, uma proteína repressora da transcrição e que tem influência no processo apoptótico. (87,88) Apesar de existirem algumas mutações relativamente frequentes nestes doentes, esta é a mais comum e, eventualmente, a única que se pode usar como fator de prognóstico para avaliar a eficácia da terapêutica imunossupressora. As mutações no gene *PIG-A*, implicado na HPN, podem também indiciar outras alterações genéticas primárias ou secundárias à AA adquirida. (86)

## Tratamento

O tratamento para esta patologia, independentemente do seu carácter de suporte ou específico, deve ter como principais focos a qualidade de vida e a minimização dos sintomas do doente, e a restituição da hematopoiese para níveis fisiológicos.

### Tratamento de suporte

O tratamento de suporte deve ter como principal foco melhorar a qualidade de vida do doente, independentemente do tratamento específico usado, minimizando os sintomas e mantendo níveis de células sanguíneas compatíveis com a segurança do doente. (60)

#### Transfusão de produtos sanguíneos

Nos doentes com AA adquirida, a transfusão de eritrócitos permite melhorar os sintomas de anemia. Este procedimento deve ser ponderado considerando os sintomas, a idade e comorbilidades associadas do doente, estes fatores influenciam o valor de concentração de Hb do doente, que determinará a necessidade de realização de transfusão. Para reduzir os riscos de aloimunização, deve procurar-se transfundir sangue de fenótipo Rh e Kell compatível. A terapia com agentes quelantes de ferro, nomeadamente deferassirox 20-30 mg/kg/dia, deve ainda ser considerada para prevenir ou minimizar a sobrecarga de ferro. Esta pode ser monitorizada através da determinação dos níveis de ferritina sérica – deve ser iniciada a administração de quelantes de ferro quando os níveis de ferritina são superiores a 1000 ng/L – e da realização de ressonância magnética, para avaliar a deposição de ferro no tecido cardíaco e hepático. (10,60)

O nível de plaquetas nestes doentes deve ser cuidadosamente monitorizado, na medida em que estão sob risco muito grave de sofrerem hemorragia interna. Neste sentido, devem manter-se níveis de plaquetas superiores a  $10 \times 10^9/L$ , ou  $20 \times 10^9/L$  para doentes com risco acrescido de hemorragia, como indivíduos sujeitos a procedimentos médicos invasivos, ou com sépsis, por exemplo, ou ainda em tratamento com imunossupressor, que pode agravar a trombocitopenia transitoriamente. (60,89,90)

A transfusão de concentrados de granulócitos deve estar reservada à utilização em caso de infeções graves no contexto de uma neutropenia severa. (10) Em qualquer dos casos, a utilização de sangue leucodepletado reduz o risco de aloimunização e rejeição de transplante de células estaminais hematopoiéticas. Qualquer um dos componentes celulares do sangue administrados deve ser previamente irradiado para prevenir o aparecimento de GVHD associada a transfusões, e aloimunização, particularmente em doentes candidatos a transplante de células estaminais hematopoiéticas. (60,91)

### Prevenção de infecções em doentes neutropênicos

A principal medida de prevenção de infecções em doentes que apresentam neutropenia severa é o isolamento, condição sob a qual devem permanecer quando em regime de internamento hospitalar. De acordo com a política de utilização de agentes antimicrobianos de cada país, a sua utilização (de antibióticos e antifúngicos) deve ser profilática, tendo como foco os microrganismos nosocomiais mais prevalentes e que constituam uma ameaça maior de constituir uma causa de sépsis. A administração de antivirais deve ser feita durante e após a terapêutica imunossupressora. (60)

### Tratamento específico

Ao contrário dos doentes com AA adquirida moderada, que podem atingir a remissão espontaneamente, manterem-se estáveis durante longos períodos e para os quais a terapia imunossupressora pode ter mais efeitos de toxicidade do que propriamente benéficos, os doentes com AA adquirida severa e dependentes de transfusões devem iniciar o tratamento específico, quando clinicamente adequado, o quanto antes após a conclusão do processo de diagnóstico. Com efeito, um intervalo de tempo superior a 2-3 meses entre o diagnóstico e o início do tratamento revelou-se prejudicial no prognóstico destes doentes. (92–95)

Atualmente, é aceite que os fatores mais significativos para um bom prognóstico do tratamento específico da AA adquirida são uma menor severidade da doença, a idade do doente (idealmente jovem) e o intervalo o mais reduzido possível entre o diagnóstico e o início do tratamento. (96)

As atuais indicações de tratamento específico da AA adquirida incluem a terapia imunossupressora e o transplante de células estaminais hematopoiéticas da medula óssea. Apesar de a sobrevida dos doentes que são submetidos a um e outro tratamento tenda a ser equivalente, há diferenças no que respeita à recuperação da função hematopoiética, às complicações e efeitos secundários associados, e à recuperação da qualidade de vida do doente. (37) Ainda que a sobrevida tenda a diminuir com o avançar da idade do doente, este não é um fator de exclusão por si só, o que implica é uma avaliação mais cuidada da severidade da doença (particularmente da neutropenia), da presença de comorbilidades, do risco de infeção e da vontade do doente em ser submetido ao tratamento imunossupressor. (37,97)

### Terapia imunossupressora

A terapia imunossupressora usada no tratamento da anemia aplástica adquirida consiste num regime terapêutico combinado de globulina antitimocítica (ATG; *anti-thymocyte globulin*) e ciclosporina A (CSA). (37,60,90,98) Este constitui o tratamento de primeira linha em doentes com AA adquirida que, ainda que não em grau severo, sejam dependentes

de transfusões ou apresentem risco de hemorragias ou infecções, e em doentes de grau severo ou muito severo com idade superior a 35-50 anos e/ou para os quais não exista um dador de células estaminais hematopoiéticas compatível. (60) Nos doentes mais jovens, a sobrevida global é de aproximadamente 90%. (59) No entanto, a mortalidade em doentes com idade superior a 60 anos tratados com ATG revela-se maior, e a taxa de sobrevivência é de 50%. (99,100) Pode ser indicada a repetição do ciclo de tratamento imunossupressor se o doente não responder de todo, se ocorrer recidiva da doença após resposta ao tratamento, ou se o doente não for elegível para transplante de células estaminais hematopoiéticas. (90,98)

A resposta ao tratamento imunossupressor, normalmente, é demorada - em média é de 3 a 4 meses. Após 6 meses, a taxa de resposta ao tratamento com ATG é de cerca de 70%. A sobrevida global dos doentes submetidos a este tratamento após um ano é de 70-80%. Após 5 anos, a sobrevida dos doentes está altamente dependente da sua idade, sendo superior a 90% para doentes com idade inferior a 20 anos, decrescendo gradualmente para uma sobrevida de 56% em doentes com idade superior a 60 anos. (60,65,99,101,102)

A ausência de resposta à imunossupressão convencional, que pode atingir 40% dos doentes (101), pode dever-se a: (i) imunossupressão inadequada, (ii) deficiência irreversível de células estaminais hematopoiéticas, (iii) AA adquirida não mediada por processo imune. (37)

Este tratamento, sobretudo envolvendo a ATG, deve ser administrado a doentes em regime de internamento hospitalar, já que se trata de um fármaco imunossupressor muito forte e que implica monitorização. (60)

Atualmente, não há indicações de complementar a terapêutica com fatores de crescimento hematopoiéticos, já que não se revelam úteis na normalização dos níveis de componentes celulares do sangue. (103) Pode, no entanto, complementar-se este regime terapêutico com prednisolona, no sentido de prevenir os efeitos secundários da ATG. (60)

Antes de iniciar a terapia imunossupressora, o clínico deve assegurar-se que o doente está estável, apirético, e que apresenta uma contagem de plaquetas estável e idealmente superior a  $20 \times 10^9/L$ . Deve ainda ser administrada uma terapêutica profilática antifúngica, antiviral e antibacteriana, e as comorbilidades associadas ao doente, principalmente se este for de idade superior a 60 anos, devem ser estudadas. Após o tratamento, deve ser evitada qualquer vacinação, sob risco de a doença recidivar. (60)

Segundo as orientações do *British Committee For Standards In Haematology*, a dose atualmente administrada de ATG é de 40 mg/kg/dia durante 4 dias, administrada por via

endovenosa através de catéter venoso central (não deve ser administrado através das veias periféricas, visto ser esclerosante para estas) durante 12 a 18 horas. (59,60) Cada dose deve ser precedida pela administração de prednisolona por via endovenosa, 1 mg/kg, e de transfusão de plaquetas, sendo a primeira administrada ainda durante duas semanas, isto um dia após o término da terapia imunossupressora com ATG. Qualquer episódio febril deve ser tratado com terapia antimicrobiana endovenosa de largo espectro. (37,60,90)

Os efeitos secundários associados à ATG incluem, numa fase mais precoce do tratamento, febre, eczema, hipo/hipertensão e retenção de líquidos. Posteriormente, pode desenvolver-se *serum sickness*, uma reação de hipersensibilidade do tipo III que resulta da administração de proteínas ou soros heterólogos, e que cursa com artralgia, mialgia, eczema e febre. (60,104) Esta reação adversa pode ser prevenida com a administração de corticosteroides, como a prednisolona. (11) O risco de evolução clonal é atualmente de 15% para SMD ou LMA e de 10% para a HPN. (90,105)

Após terminada a administração de prednisolona, deve iniciar-se a administração de CSA numa dose de 5 mg/kg/dia, durante um mínimo de 12 meses após o doente atingir com sucesso resposta à terapêutica. Os níveis de CSA no sangue devem estar compreendidos entre 100-200 ng/mL. (60,100) A dose de CSA deve ser reduzida lenta e gradualmente, não antes dos 24 meses. (10)

Os doentes que apresentem recidivas, o que acontece em 35-40% dos casos tratados com ATG (60,90), podem receber um segundo ciclo de terapia imunossupressora, o que se associa com uma taxa de sobrevida de 75%, isto se não houver disponibilidade de um dador compatível. Pode ocorrer uma resposta hematológica seguida de uma recidiva, ou não haver de todo uma resposta à imunossupressão. No primeiro caso, estes doentes têm um prognóstico mais favorável de resposta a um segundo ciclo de imunossupressão (50-80%). O segundo grupo de doentes apresenta apenas 20-30% de resposta a este segundo ciclo de tratamento. (106)

Caso não ocorra resposta a um segundo ciclo de tratamento, o doente tem como opções: (i) um terceiro ciclo de terapia imunossupressora; (ii) transplante de células estaminais hematopoiéticas de um dador não totalmente compatível (*haplo-identical*); (iii) transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical; (iv) tratamento farmacológico alternativo. Estas opções devem ser consideradas à luz do estado clínico do doente, tendo em conta a severidade da neutropenia, o risco de infeções e a resposta hematológica a transfusões. No entanto, as opções (ii) e (iii) constituem ainda práticas experimentais, no contexto apenas de ensaios clínicos. (10,60)

### Transplante de células estaminais hematopoiéticas

O transplante de células estaminais hematopoiéticas é o tratamento de primeira escolha se houver um dador compatível, sobretudo em doentes jovens, preferencialmente com idade inferior a 50 anos. Os doentes com idade inferior a 20 anos e baixo número de neutrófilos (inferior a 200/mL) são os que mais podem vir a beneficiar do transplante de células estaminais hematopoiéticas da medula óssea. (60,93,96,107) Nos doentes jovens, com idade inferior a 16 anos, a sobrevida é de cerca de 91%. O transplante pode ser uma opção em doentes mais velhos, se clinicamente estiverem em condições para submissão a transplante de células estaminais hematopoiéticas, particularmente se não apresentarem comorbilidades que os coloquem em risco durante e após o transplante. (37,59,90) De acordo com o trabalho da *European Society for Blood and Marrow Transplantation (Severe Aplastic Anemia Working Party – SAAWP-EBMT)*, o prognóstico para doentes entre os 30 e os 40 anos revela-se semelhante ao dos doentes entre os 40 e os 50 anos de idade, atingindo uma taxa de sobrevida de 70 a 85%. (107) Ainda assim, de um modo geral, o prognóstico é mais favorável para doentes mais jovens submetidos a transplante de células estaminais hematopoiéticas. De facto, observa-se um paradoxo, na medida em que para o tratamento de LMA ou SMD consegue-se que este transplante tenha sucesso em doentes com 70 anos, mas os doentes com AA adquirida severa com mais de 40 anos submetidos a transplante ainda enfrentam uma mortalidade global de 40%. (96) Outros fatores de influência no sucesso deste procedimento são as transfusões a que o doente tenha sido sujeito e o uso de ciclosporina e de irradiação num ciclo prévio de imunossupressão (no caso deste ter existido). (84) Para os doentes que não respondam a um ou mais ciclos de terapia imunossupressora, deve ser ponderada a hipótese de procurar um dador de células estaminais compatível fora do círculo familiar. (60)

Para avaliação da compatibilidade, todos os doentes candidatos a transplante devem ser avaliados por uma equipa médica multidisciplinar e submetidos a tipagem do sistema HLA logo aquando o diagnóstico. Esta análise vai permitir que, ao proceder ao transplante o mais precocemente possível, se possa minimizar o risco de sensibilização aos antígenos do sistema HLA e outros antígenos de histocompatibilidade por parte do doente, e agilizar a procura de um dador compatível fora da família, se necessário. (60) De facto, a maior preocupação após o transplante será a possibilidade de ocorrer rejeição ou GVHD, seja de início precoce ou tardio. A taxa de rejeição varia entre 1 a 25%, dependendo dos regimes de condicionamento adotados e da duração do recurso a transfusões como tratamento de suporte após o transplante, e pode ocorrer sob várias formas. Estas incluem: (i) ausência de hematopoiese a partir das células estaminais do dador, o que se reflete numa falha em atingir uma contagem absoluta de neutrófilos superior a 500/mL (rejeição primária), (ii)

rejeição aguda ou precoce, (iii) rejeição tardia e progressiva, na qual se observa uma recuperação parcial dos níveis hematológicos, proporcionada pelas células do dador, mas seguida de uma pancitopenia recorrente e perda desse processo hematopoiético e (iv) rejeição aguda após descontinuidade da administração de ciclosporina A como terapia profilática, sendo as três últimas formas de rejeição secundária. A rejeição primária apresenta um mau prognóstico, com uma sobrevivência destes doentes de 17%, ao passo que a rejeição tardia apresenta um prognóstico melhor, na medida em que este último grupo de doentes tem hipótese de recuperar após o início ou reintrodução da imunossupressão ou após um novo transplante de células estaminais hematopoiéticas da medula óssea. Deste modo, impõe-se a necessidade de investigar novos regimes de condicionamento antes e após o transplante de células estaminais hematopoiéticas, no sentido de prevenir a rejeição e a GVHD. (37,84)

#### *Regime de condicionamento*

Os doentes que vão ser submetidos a transplante de células estaminais hematopoiéticas devem ser submetidos a um regime terapêutico de condicionamento. Porém, antes de se proceder ao mesmo, é necessário avaliar diversos fatores que vão influenciar o condicionamento a transplante de células estaminais no doente.

Este processo pré-condicionamento consiste em: (i) confirmar e reavaliar o diagnóstico de AA adquirida (e excluir formas congénitas, cujo regime de condicionamento é diferente e que não podem ser tratadas como AA adquirida, pois há o risco de não ocorrer resposta ao tratamento) através de nova biópsia e aspirado medular, análise citogenética e FISH; (ii) avaliar a presença de comorbilidades – particularmente sinais de sobrecarga de ferro, derivada das múltiplas transfusões a que estes doentes são sujeitos, através da avaliação dos níveis de ferritina sérica e da ressonância magnética para avaliar a deposição de ferro no coração e fígado - e de sinais de evolução clonal; (iii) avaliar os títulos de anticorpos anti-HLA (iii) selecionar, com base no historial e quadro clínico do doente, o dador, o regime de condicionamento e a dose de células estaminais a transplantar – a dose deve ser elevada, de pelo menos  $3 \times 10^6$  células CD34+/kg, ou  $3 \times 10^8$  células nucleadas totais/kg; (108,109) e (iv) avaliar o risco de sequelas ao nível da fertilidade, particularmente em doentes em idade fértil que devem ser acompanhados em consultas da especialidade e aos quais devem ser oferecidas alternativas, se necessário. (60)

O regime de condicionamento inclui, para os doentes com idade inferior a 30 anos, ciclofosfamida em dose elevada (50 mg/kg/dia, durante 4 dias), e para os doentes entre os 30 e 50 anos de idade, um regime baseado em fludarabina e ciclofosfamida em doses mais moderadas (120 mg/kg). (107) A combinação da fludarabina com a ciclofosfamida permite reduzir a dose deste último fármaco, e desta forma prevenir efeitos tóxicos e sequelas na



fertilidade. (59) A fludarabina tem sido particularmente útil neste regime de condicionamento em doentes mais velhos, submetidos a um grande volume de transfusões e por vezes já aloimunizados. (12) Uma vez que o transplante de células estaminais hematopoiéticas produz resultados pouco satisfatórios em termos de taxas de sucesso e sobrevida nos doentes com idade superior a 30-40 anos, no regime de condicionamento a combinação de fludarabina e ciclofosfamida em associação à ATG pode ser equacionada. A ATG é administrada em doses de 2,5 mg/kg entre o 4º e o 2º dia antes do transplante; a ciclofosfamida em dose de 50 mg/kg/dia entre o 5º e 2º dia deste período. (10,37) A taxa de mortalidade com este procedimento é inferior a 30%, e a taxa de sobrevida após 5 anos é de 76%. (10,37,110) Este procedimento permite reduzir o risco de desenvolver GVHD crónica, apesar de não ser um regime de condicionamento mieloablativo. Não há indicação terapêutica para o uso de radiação, no sentido de reduzir a incidência de GVHD e de outras complicações associadas ao transplante. (12,107)

Após o transplante, como profilaxia contra a GVHD, deve ser administrado metotrexato 8 mg/m<sup>2</sup> no 1º, 3º, 6º e 11º dias e ciclosporina A, por via oral, 1,5 mg/kg a cada 12 horas, mantendo os níveis sanguíneos entre os 150 e 250 ng/mL, durante 9 a 12 meses após o transplante, sendo posteriormente reduzida gradualmente a dose com monitorização periódica – nomeadamente se existirem falhas na função renal. Esta intervenção terapêutica é bem-sucedida em 84% dos doentes. (10,37)

Deve ainda observar-se um especial cuidado em monitorizar o quimerismo das células T CD3<sup>+</sup> do sangue periférico e da medula óssea destes doentes, no sentido de prevenir a rejeição do tecido transplantado. O quimerismo misto, que é o que se pretende evitar, refere-se à coexistência, após um transplante de células estaminais hematopoiéticas, de células hematopoiéticas do dador e do recetor no sangue periférico e medula óssea deste último. Um quimerismo misto progressivo (um aumento igual ou superior a 5% das células do doente face às do dador), sobretudo após o término do regime de condicionamento imunossupressor, vem agravar o risco de rejeição do transplante. No entanto, é comum observar-se um quimerismo estável das células T, e um quimerismo completo da linhagem mieloide, isto é, a substituição total por células do dador. (12,111,112)

Posteriormente, deve manter-se uma vigilância cuidada do doente a longo prazo, através do rastreio de neoplasias, de sobrecarga de ferro, e de risco acrescido de complicações a longo prazo para o sistema endócrino, esquelético e cardiovascular. (60,113)

## Novas estratégias de abordagem ao doente

Apesar de a administração de ATG e ciclosporina A constituir a abordagem terapêutica convencional, esta ainda apresenta uma proporção relativamente elevada de doentes nas

quais não se observa a eficácia desejada, persistindo uma pancitopenia severa nestes doentes após um ou mesmo dois ciclos de imunossupressão.

Os mecanismos que justificam este facto continuam por esclarecer. No entanto, colocam-se algumas hipóteses, nomeadamente: (i) o número de células estaminais hematopoiéticas residentes pode ser demasiado baixo para possibilitar um processo hematopoiético fisiologicamente normal após a imunossupressão, (ii) o agente imunossupressor utilizado pode não ser o mais adequado ao doente, (iii) o doente pode apresentar uma telomeropatia, o que torna o tratamento imunossupressor infrutífero. O insucesso em algumas situações da terapêutica imunossupressora, aliado ao facto de a terapia convencional com ATG apresentar uma elevada toxicidade e efeitos secundários muito marcados, justifica a procura de novas abordagens terapêuticas, nomeadamente novos agentes imunossupressores. (96)

As alternativas apresentadas aos doentes que não respondem à terapêutica *standard* ou não são elegíveis para transplante de células estaminais são ainda muito limitadas, a maior parte encontra-se ainda em fases precoces de ensaios clínicos, sendo que os estudos foram realizados numa amostra populacional ainda muito reduzida, insuficiente para produzir resultados credíveis.

### Alemtuzumab

O alemtuzumab é um anticorpo monoclonal anti-CD52, que causa lise das células que expressam CD52 (maioritariamente linfócitos, associado ao GPI, mas não as células estaminais ou progenitoras hematopoiéticas) através de mecanismos de citotoxicidade mediada por anticorpos e sistema de complemento. (59,101) Este fármaco era originalmente aplicado no tratamento de neoplasias linfoides. Já foi testado em doentes com AA que não responderam ou que sofreram recidivas após a imunossupressão convencional, apresentando nestes casos uma eficácia de 35% e 55% respetivamente; uma taxa de sobrevida após 4 anos de 67%, e uma taxa de sobrevida sem doença, com níveis hematológicos razoavelmente seguros e sem risco agravado de infeção, de 37%, também foram reportados. (60,114) Para o tratamento das recidivas, que são relativamente comuns, pode ser equacionado um ciclo adicional de tratamento. (37,115)

Assim, o alemtuzumab constitui uma opção terapêutica, ainda que não convencional, em doentes que: (i) não tenham a possibilidade de ser submetidos a um segundo ciclo de terapia com ATG, (ii) apresentam anomalias na função renal, (iii) não sejam elegíveis para transplante de células estaminais hematopoiéticas. Nestes casos, é administrada uma dose total de 110 mg, dividida em doses de 10, 30, 30 e 40 mg por via subcutânea durante 4 dias. Os doentes que seguirem esta abordagem terapêutica devem ser referenciados à EBMT. (60)

### Eltrombopag

O eltrombopag é um fármaco agonista do recetor da trombopoietina (c-MPL), promotora da megacariocitopoiese, que é administrado por via oral. Foi inicialmente aprovado no tratamento da púrpura trombocitopénica autoimune crónica nos Estados Unidos da América, e atualmente é considerado um fármaco alternativo à ATG e à ciclosporina A. (96) A sua utilização no tratamento da AA adquirida severa em doentes que sofrem recidivas após a terapia imunossupressora convencional foi aprovada pela *Food and Drug Administration* em 2015. (60)

A sua eficácia parece dever-se ao facto de o recetor da trombopoietina, c-MPL, estar presente nas células estaminais hematopoiéticas, e de a trombopoietina ter também um papel na sobrevivência e expansão do *pool* de células estaminais hematopoiéticas. (116)

De acordo com os resultados de um ensaio clínico publicados em 2014, realizado em 43 doentes, a taxa de resposta hematopoiética era de 40%, sendo a terapêutica bem tolerada pela maioria dos doentes. Ainda que originalmente a sua utilização fosse destinada a doentes com trombocitopenias autoimunes, verificou-se que o eltrombopag tinha um efeito estimulador nas várias linhagens celulares hematopoiéticas. No entanto, requer uma monitorização cuidada, dado o risco de evolução clonal para SMD; o aparecimento da monossomia 7, uma anomalia citogenética típica de SMD, pode ocorrer. (117)

### Ciclofosfamida

A ciclofosfamida tem sido usada no regime de condicionamento dos doentes a serem submetidos a transplante. No contexto de uma terapia imunossupressora, a ciclosporina em doses moderadas a elevadas (200 mg/kg, em 4 doses de 50 mg/kg durante 4 dias), associa-se a uma alta percentagem de doentes com infeções fúngicas invasivas (particularmente em doentes com pancitopenia muito severa e prolongada) e com evolução clonal, apesar de a taxa de sobrevida na generalidade atingir os 78%. (19) Num estudo levado a cabo no Hospital John Hopkins (Baltimore, Estados Unidos da América), o uso de ciclofosfamida permitiu obter uma resposta eficaz a curto prazo em 70% dos doentes não submetidos a qualquer outro tratamento, e uma resposta de 48% em doentes que não respondiam à imunossupressão convencional, ainda que associado a um nível de toxicidade razoável. A longo prazo, com o uso de ciclosporina, a taxa de sobrevida após 10 anos situava-se em 88%, sendo que 58% dos doentes conseguiram-no sem ser registada qualquer falha na resposta ao tratamento; no entanto, apenas 28% dos doentes nos quais a imunossupressão se revelava infrutífera alcançou uma sobrevida de 10 anos. (118)

Assim, e dada a elevada toxicidade geral, é apenas considerada como opção de último recurso em doentes que não conseguem responder ao tratamento, atingindo uma taxa de

eficácia de 50% em doentes que sofreram recidivas após a terapia imunossupressora convencional. (10,114,119,120)

## Abordagens terapêuticas específicas

### Tratamento da AA no idoso

Como já vem sendo referido, o tratamento da AA adquirida em doentes mais velhos revela-se difícil, com baixas taxas de resposta e eficácia dos tratamentos e de sobrevida dos doentes, e com pouca tolerância dos doentes aos tratamentos imunossupressores, cuja toxicidade neste grupo etário pode ser mais notória. Neste sentido, devem ser avaliadas as comorbilidades presentes em cada doente, e acima de tudo, respeitada a sua vontade ou a da família em serem ou não submetidos a imunossupressão, que não é, à partida, interdita mesmo em doentes de idade muito avançada. Este é normalmente, de facto, o tratamento de primeira linha para estes doentes, já que, nos doentes acima de 60 anos de idade, se exclui a possibilidade de o transplante de células estaminais hematopoiéticas ser o tratamento de primeira linha.

Idealmente, o tratamento de imunossupressão deve caracterizar-se por baixa toxicidade e poucas implicações na qualidade de vida do doente, devendo ser contrabalançados os riscos e benefícios de cada opção terapêutica. No entanto, nos doentes com neutropenia associada a risco de infeções graves ou aqueles que, por essa razão, tenham tido necessidade de hospitalização, em caso de equacionada a imunossupressão, é necessário reconsiderar este princípio e avançar para uma abordagem terapêutica mais intensa. (60)

O tratamento com ATG e CSA resulta numa melhor e mais rápida recuperação dos níveis hematopoiéticos normais. (121) No entanto, atendendo ao historial e quadro clínico individual, os riscos e benefícios deste tratamento devem ser calculados, dado que, em doentes mais velhos, o risco de infeção, hemorragia, insuficiência cardíaca e arritmias é elevado durante o tratamento com ATG. (122)

Em alternativa, pode recorrer-se a administração isolada de CSA, ou a oximetolona ou danazol, ambos esteroides, ou ao alemtuzumab. Utilizada isoladamente, a CSA não oferece uma resposta tão eficaz; no entanto, os doentes que recidivam após este ciclo de imunossupressão respondem mais facilmente a um ciclo de tratamento com ATG e CSA. (121) Além disso, não obriga o doente a estar em regime de internamento hospitalar, ainda que a nefrotoxicidade seja um risco a monitorizar cuidadosamente. (60) O alemtuzumab também pode ser utilizado isoladamente em casos de ausência de resposta ou de recidiva, mas é necessária uma cuidada avaliação clínica para verificar se este tratamento é indicado para o doente. (114) Os esteroides oximetolona e danazol causam vários efeitos secundários,

derivados da sua toxicidade, e têm ação anabolizante, mais notória para o primeiro fármaco, pelo que o seu uso requer uma monitorização rígida.

Dada a elevada toxicidade da maioria destes agentes e ainda que, à partida, esta seja uma alternativa aberta a todos os doentes, há doentes efetivamente intolerantes ao tratamento de imunossupressão, e há ainda doentes que rejeitam a terapêutica. (60)

### Tratamento da AA na grávida

Apesar de não ser uma relação consensual a que se estabelece entre a AA e a gravidez – podendo ou não ser considerada uma AA secundária à gravidez – não deixa de ser grave e as consequências são difíceis de controlar ao longo da gestação quer para a mãe, quer para o bebé.

Pode surgir e ser diagnosticada em qualquer fase da gestação, sendo que o grau de citopenia(s) tende a aumentar progressivamente com esta, podendo regredir à normalidade de forma espontânea após o parto, aborto espontâneo ou interrupção da gravidez. (60,123) Pode ainda surgir em doentes que já sofreram de AA adquirida, já tratadas com sucesso com ATG e que sofreram uma recidiva na sequência da gravidez. (116) No entanto, isto não ocorre em doentes submetidas a transplante de células estaminais hematopoiéticas com sucesso.

O tratamento de suporte é a melhor alternativa a oferecer às grávidas às quais é diagnosticada AA. Os riscos associados a esta patologia devem sempre ser discutidos com a grávida, devendo esta ser frequentemente monitorizada pelas equipas de Obstetrícia e Hematologia, que devem decidir, nomeadamente, como se procederá ao parto.

Assim, a manutenção dos níveis de plaquetas acima de  $20 \times 10^9/L$  deve ser a principal preocupação. Se necessário, pode ser administrada CSA, pois é relativamente segura a sua utilização durante a gravidez. (60,124)

### Critérios de avaliação da resposta ao tratamento

Atualmente, considera-se que o doente com AA adquirida severa responde à terapia imunossupressora se a sua contagem de células do sangue periférico normalizar, isto é, se mantiver uma concentração de Hb adequada à idade e género (geralmente igual ou superior a 12 g/L), uma contagem de neutrófilos superior a  $1,5 \times 10^9/L$  e de plaquetas superior a  $150 \times 10^9/L$ , sem necessidade de recorrer a processos de transfusão.

Pode atingir um grau de resposta apenas parcial, no qual, ainda que o doente seja independente de transfusões, não atinge níveis hematológicos considerados como normais, mas já está fora dos critérios que definem AA adquirida severa, ou seja, apresente um

número de neutrófilos igual ou superior a  $0,5 \times 10^9/L$  e de plaquetas igual ou superior a  $20 \times 10^9/L$ .

Seguindo um raciocínio semelhante, e de acordo com os critérios de avaliação de eficácia do tratamento de imunossupressão, um doente não responde à terapia imunossupressora se continuar dependente de transfusões de produtos sanguíneos e os seus níveis hematopoiéticos se encaixarem nos critérios já descritos de AA adquirida severa. (9,60)

## Conclusão

A hematopoiese ineficaz é a característica fundamental das síndromes que se associam com falha da atividade hematopoiética da medula óssea. A AA caracteriza-se por aplasia da medula óssea e pancitopenia periférica. A AA adquirida é a causa mais frequente de anemia aplástica.

Um dos mecanismos fisiopatológicos propostos para a doença tem como base uma resposta imune exacerbada dirigida contra as células progenitoras hematopoiéticas, desencadeada por linfócitos T citotóxicos, associada a aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$ .

A contagem total e diferencial das células do sangue e avaliação anátomo-patológica da medula óssea são necessárias para a elaboração do diagnóstico de anemia aplástica adquirida. As técnicas de biologia molecular e citogenética, importantes também no processo de diagnóstico, têm sido cruciais em elucidar diversos aspectos fisiopatológicos da AA adquirida, nomeadamente aspectos genéticos que poderão ser particularmente úteis na caracterização do quadro clínico do doente, no diagnóstico e prognóstico desta patologia. A imagiologia tem também um papel importante no diagnóstico, nomeadamente no diagnóstico diferencial, de AA adquirida.

A AA adquirida severa pode ser tratada com recurso a terapêutica imunossupressora ou transplante de células estaminais hematopoiéticas, tendo ambas as abordagens uma taxa de sucesso considerável, principalmente nos indivíduos mais jovens. No entanto, o risco de infeções generalizadas graves, de evolução clonal para mielodisplasia ou leucemia mieloide aguda, a ausência de dador compatível, a ocorrência de doença do enxerto *versus* hospedeiro crónica em caso de transplante, vêm dificultar o tratamento e o seu sucesso. Ainda assim, têm-se conseguido melhorias significativas com o aparecimento de terapêuticas alternativas, bem como com o transplante a partir de dadores fora do círculo familiar do doente ou de dadores haplo-compatíveis.

O prognóstico e o tratamento com sucesso dos doentes diagnosticados com AA adquirida têm melhorado substancialmente ao longo das últimas décadas. A intervenção clínica precoce tem-se revelado um fator associado a um prognóstico favorável. Além disso, a evolução da terapêutica de suporte, nomeadamente o controlo e prevenção de infeções, tem contribuído para uma maior sobrevida dos doentes.

Importa adequar a abordagem clínica ao doente, apresentando alternativas de tratamento adequadas à sua história clínica, ao seu quadro clínico e às comorbilidades que apresenta. Em suma, os objetivos da abordagem clínica do doente com AA adquirida visam a

restituição da hematopoiese para níveis fisiologicamente aceitáveis, mas também contribuir para a melhoria da qualidade de vida destes doentes.



## Bibliografia

1. Camitta BM, Storb R, Thomas ED. Aplastic Anemia - Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Prognosis. *N Engl J Med*. 1982;306(11):645–52.
2. Marmont AM. Who really discovered aplastic anemia? *Haematologica*. 1995;
3. Schrezenmeier H, Bacigalupo A. *Aplastic Anemia: Pathophysiology and Treatment*. Cambridge University Press; 2000.
4. Rose NR, Mackay IR. *The Autoimmune Diseases*. 5.<sup>a</sup> ed. Rose NR, Mackay IR, editores. *The Autoimmune Diseases*. Oxford, UK: Elsevier Academic Press; 2006. 103-118 p.
5. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*. 2006;108(8):2509–19.
6. Young NS. Acquired Aplastic Anemia. *Ann Intern Med*. 2002;136(7):534–46.
7. Schrezenmeier H, Brümmendorf TH, Deeg HJ, Höchsmann B, Linkesch W, Röth A, et al. Aplastic Anemia - Diagnostics and Therapy of Acquired Aplastic Anemia [Internet]. *Onkopedia Guidelines*. 2012 [citado 6 de Julho de 2016]. Disponível em: <https://www.onkopedia-guidelines.info/en/onkopedia/guidelines/aplastic-anemia-diagnostics-and-therapy-of-acquired-aplastic-anemia/@@view/html/index.html>
8. Gandhi S, Abuarqoub H, Kordasti S, Jiang J, Kulasekararaj A, Mufti G, et al. Pathology of bone marrow failure syndromes. *Diagnostic Histopathol*. 2015;21(5):174–80.
9. Rovó A, Tichelli A, Dufour C. Diagnosis of acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(October 2012):162–7.
10. Barone A, Lucarelli A, Onofrillo D, Verzegnassi F, Bonanomi S, Cesaro S, et al. Diagnosis and management of acquired aplastic anemia in childhood. Guidelines from the Marrow Failure Study Group of the Pediatric Haemato-Oncology Italian Association (AIEOP). *Blood Cells, Mol Dis*. 2015;55(1):40–7.
11. Hoffbrand AV, Moss PAH. *Hoffbrand's Essential Haematology*. 7.<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, editor. *Hoffbrand's Essential Haematology*. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2016.
12. E. DeZern A, A. Brodsky R. Clinical management of aplastic anemia. *Expert Rev Hematol*. 2011;4(2):221–30.

13. Young NS, Kaufman DW. The epidemiology of acquired aplastic anemia. *Haematologica*. 2008;93(4):489–92.
14. Montané E, Ibáñez L, Vidal X, Ballarín E, Puig R, García N, et al. Epidemiology of aplastic anemia: A prospective multicenter study. *Haematologica*. 2008;93(4):518–23.
15. Issaragrisil S, Sriratanasatavorn C, Piankijagum A, Vannasaeng S, Porapakkham Y, Leaverton PE, et al. Incidence of aplastic anemia in Bangkok. The Aplastic Anemia Study Group. *Blood*. 1991;77(10):2166–8.
16. Issaragrisil S, Kaufman DW, Anderson T, Chansung K, Leaverton PE, Shapiro S, et al. The epidemiology of aplastic anemia in Thailand. *Blood*. 2006;107(4):1299–307.
17. Yang C, Zhang X. Incidence survey of aplastic anemia in China. *Chin Med Sci J*. 1991;6(4):203–7.
18. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Santos G, Gordon-Smith EC, Gale RP, et al. Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. *Blood*. 1976;48(1):63–70.
19. Kaufman DW, Kelly JP, Jurgelon JM, Anderson T, Issaragrisil S, Wiholm BE, et al. Drugs in the aetiology of agranulocytosis and aplastic anaemia. *Eur J Haematol Suppl*. 1996;60(1):23–30.
20. Li JP, Zheng CL, Han ZC. Abnormal immunity and stem/progenitor cells in acquired aplastic anemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;75(2):79–93.
21. Li J, Zhao Q, Xing W, Feng J, Wu H, Li H, et al. Interleukin-27 enhances the production of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  by bone marrow T lymphocytes in aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2011;153(6):764–72.
22. Lin FC, Karwan M, Saleh B, Hodge DL, Chan T, Boelte KC, et al. IFN-gamma causes aplastic anemia by altering hematopoietic stem/progenitor cell composition and disrupting lineage differentiation. *Blood*. 2014;124(25):3699–708.
23. Young NS, Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med*. 1997;336(12):1365–72.
24. Gu Y, Zhang J, Peng J, Hu X, Xu C. Elevated expression of IL-12 and IL-23 in patients with aplastic anemia. *Int J Lab Hematol*. 2009;31(2):207–14.
25. Gee K, Guzzo C, Mat NFC, Kumar WM and A. The IL-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. Vol. 8, Inflammation &

- Allergy-Drug Targets (Discontinued). 2009. p. 40–52.
26. Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 Induces Th1 Differentiation via p38 MAPK/T-bet- and Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA-1/ERK1/2-Dependent Pathways. *J Immunol.* 2006;177(11):7579–87.
  27. Liu CY, Fu R, Wang HQ, Li LJ, Liu H, Guan J, et al. Fas/FasL in the immune pathogenesis of severe aplastic anemia. *Genet Mol Res.* 2014;13(2):4083–8.
  28. Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Battilana N, Pistoia V. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2001;115(4):1023–31.
  29. Hara T, Ando K, Tsurumi H, Moriwaki H. Excessive production of tumor necrosis factor-alpha by bone marrow T lymphocytes is essential in causing bone marrow failure in patients with aplastic anemia. *Eur J Haematol.* 2004;73(1):10–6.
  30. Chen Y, Zou Z, Wu Z, Zhao Z, Luo X, Xie C, et al. TNF- $\alpha$ -induced programmed cell death in the pathogenesis of acquired aplastic anemia. *Expert Rev Hematol.* 2015;8(4):515–26.
  31. Nimer SD, Ireland P, Meshkinpour A, Frane M. An increased HLA DR2 frequency is seen in aplastic anemia patients. *Blood.* 1994;84(3):923–7.
  32. Brodsky RA, Jones RJ. Aplastic anaemia. *Lancet (London, England).* 2005;365(9471):1647–56.
  33. Zeng W, Maciejewski JP, Chen G, Young NS. Limited heterogeneity of T cell receptor BV usage in aplastic anemia. *J Clin Invest.* 2001;108(5):765–73.
  34. Nakao S, Yamaguchi M, Shiobara S, Yokoi T, Miyawaki T, Taniguchi T, et al. Interferon-gamma gene expression in unstimulated bone marrow mononuclear cells predicts a good response to cyclosporine therapy in aplastic anemia. *Blood.* 1992;79(10):2532–5.
  35. Kulasekararaj AG, Jiang J, Smith AE, Mohamedali AM, Mian S, Gandhi S, et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2014;124(17):2698–704.
  36. Dufour C, Capasso M, Svahn J, Marrone A, Haupt R, Bacigalupo A, et al. Homozygosity for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *Br*

- J Haematol. 2004;126(5):682–5.
37. Young NS, Bacigalupo A, Marsh JCW. Aplastic anemia: pathophysiology and treatment. Biol Blood Marrow Transplant. 2010;16(1 Suppl):S119–25.
  38. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. Blood. 2008;111(9):4446–55.
  39. Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JCW, Gordon-Smith EC. Progressive Telomere Shortening in Aplastic Anemia. Blood. 1998;91(10):3582–92.
  40. Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z, Okawa K, Nakao S. Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . J Immunol. 2009;182(1):703–10.
  41. Takamatsu H, Feng X, Chuhjo T, Lu X, Sugimori C, Okawa K, et al. Specific antibodies to moesin, a membrane-cytoskeleton linker protein, are frequently detected in patients with acquired aplastic anemia. Blood. 2007;109(6):2514–20.
  42. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood. 2002;99(10):3838–43.
  43. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. Blood. 2003;101(9):3722–9.
  44. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The Antiproliferative Effect of Mesenchymal Stem Cells Is a Fundamental Property Shared by All Stromal Cells. J Immunol. 2007;179(5):2824–31.
  45. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol. 2002;30(1):42–8.
  46. Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: Hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. Stem Cells. 2010;28(8):1446–55.
  47. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Dendritic Cell Differentiation and Function by Preventing Entry Into the Cell Cycle. Transplantation. 2007;83(1).
  48. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood. 2007;110(10):3499–506.

49. Clé D V., Santana-Lemos B, Tellechea MF, Prata KL, Orellana MD, Covas DT, et al. Intravenous infusion of allogeneic mesenchymal stromal cells in refractory or relapsed aplastic anemia. *Cytotherapy*. 2015;17(12):1696–705.
50. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. Vol. 36, *Europ J Immunol*. 2006. p. 2566–73.
51. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726–36.
52. Bacigalupo A, Valle M, Podestà M, Pitto A, Zocchi E, De Flora A, et al. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2005;33(7):819–27.
53. Morris VA. Defining the bone marrow microenvironment [Internet]. *Hutch News: Science Spotlight*. 2013 [citado 28 de Junho de 2016]. Disponível em: <https://www.fredhutch.org/en/news/spotlight/imports/defining-the-bone-marrow-microenvironment.html>
54. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(10):890–6.
55. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(5):1755–61.
56. Aplastic Anemia - The Aplastic Anemia and MDS International Foundation [Internet]. 2016 [citado 19 de Maio de 2016]. Disponível em: <http://www.aamds.org/diseases/aplastic-anemia/>
57. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition. McGraw-Hill Education; 2008.
58. Schubert J, Bettelheim P, Brümmendorf TH, Röth A, Schrezenmeier H, Stüssi G. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) [Internet]. *Onkopedia Guidelines*. 2012 [citado 6 de Julho de 2016]. Disponível em: <https://www.onkopedia-guidelines.info/en/onkopedia/guidelines/paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria-pnh/@@view/html/index.html>
59. Miano M, Dufour C. The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. *Int J Hematol*. 2015;101(6):527–35.

60. Killick SB, Bown N, Cavenagh J, Dokal I, Foukaneli T, Hill A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2016;172(2):187–207.
61. Matsui WH, Brodsky R a, Smith BD, Borowitz MJ, Jones RJ. Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2006;20(3):458–62.
62. Niemeyer CM, Baumann I. Classification of Childhood Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. *ASH Educ Progr B*. 2011;2011(1):84–9.
63. Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica*. 2009;94(2):264–8.
64. Philpott NJ, Scopes J, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Gibson FM. Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. *Exp Hematol*. 1995;23(14):1642–8.
65. Bacigalupo A. Aplastic Anemia: Pathogenesis and Treatment. *ASH Educ Progr B*. 2007;2007(1):23–8.
66. Guinan EC. Diagnosis and management of aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:76–81.
67. Marsh JCW, Ball SE, Darbyshire P, Gordon- Smith EC, Keidan AJ, Martin A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2003;123(5):782–801.
68. Bacigalupo A, Passweg J. Diagnosis and Treatment of Acquired Aplastic Anemia. Vol. 23, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009. p. 159–70.
69. Pu JJ, Mukhina G, Wang H, Savage WJ, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur J Haematol*. 2011;87(1):37–45.
70. Tuzuner N, Cox C, Rowe JM, Bennett JM. Hypocellular acute myeloid leukemia: the Rochester (New York) experience. *Hematol Pathol*. 1994;9(3-4):195–203.
71. Tuzuner N, Cox C, Rowe JM, Watrous D, Bennett JM. Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. *Br J Haematol*. 1995;91(3):612–7.
72. Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, et al. Downregulation of GATA-2 and overexpression of adipogenic gene-PPAR $\gamma$  in mesenchymal stem cells

- from patients with aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2009;37(12):1393–9.
73. Stalder MP, Rov?? A, Halter J, Heim D, Silzle T, Passweg J, et al. Aplastic anemia and concomitant autoimmune diseases. *Ann Hematol*. 2009;88(7):659–65.
74. Brown KE, Tisdale J, Barrett AJ, Dunbar CE, Young NS. Hepatitis-Associated Aplastic Anemia. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1059–64.
75. Narita A, Kojima S. Biomarkers for predicting clinical response to immunosuppressive therapy in aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2016;1–6.
76. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2009;144(2):206–16.
77. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Young NS. Long term outcome of pediatric patients with severe aplastic anemia treated with anti-thymocyte globulin and cyclosporine. *J Pediatr*. 8 de Julho de 2008;153(6):814–9.
78. Sloand E, Kim S, Maciejewski JP, Tisdale J, Follmann D, Young NS. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood*. 2002;100(4):1185–91.
79. Chang H, Zeng F, Zhang JY, Mu XY, Meng WT, Ma HB, et al. Association of the interferon-gamma single nucleotide polymorphism +874(T/A) with response to immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;45(4):313–6.
80. Elmahdi S, Muramatsu H, Narita A, Ismael O, Hama A, Nishio N, et al. Markedly High Plasma Thrombopoietin (TPO) Level is a Predictor of Poor Response to Immunosuppressive Therapy in Children With Acquired Severe Aplastic Anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(4):659–64.
81. Alter BP, Baerlocher GM, Savage S a, Chanock SJ, Babette B, Willner JP, et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*. 2011;110(5):1439–47.
82. Scheinberg P, Cooper JN, Sloand EM, Wu CO, Calado RT, Young NS. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *JAMA*. 2010;304(12):1358–64.

83. Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, et al. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2014;99(8):1312–6.
84. Lawler M, McCann SR, Marsh JCW, Ljungman P, Hows J, Vandenberghe E, et al. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): Indication for routine assess. *Br J Haematol*. 2009;144(6):933–45.
85. Lion T, Muller-Bérat N. Chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation: importance of timing and optimal technique for testing in different clinical–biological situations. *Leukemia*. 2003;18(2):247–247.
86. Visconte V, Lindsley RC, Berlyne D. Aplastic Anemia & MDS International Foundation (AA&MDSIF): Bone Marrow Failure Disease Scientific Symposium 2014. *Leuk Res*. 2015;39(1):110–3.
87. Zhao K, Liu Q, Caplan A, Haynesworth S, Goshima J, Goldberg V, et al. The clinical application of mesenchymal stromal cells in hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol*. 2016;9(1):46.
88. Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev*. 2000;14(14):1810–23.
89. Pulsipher M a, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, et al. Optimization of therapy for severe aplastic anemia based on clinical, biologic, and treatment response parameters: conclusions of an international working group on severe aplastic anemia convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network,. *J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2011;17(3):291–9.
90. Scheinberg P, Young NS. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;120(6):1185–96.
91. Treleaven J, Gennery A, Marsh J, Norfolk D, Page L, Parker A, et al. Guidelines on the use of irradiated blood components prepared by the British Committee for Standards in Haematology blood transfusion task force. *Br J Haematol*. 2011;152(1):35–51.
92. Dufour C, Pillon M, Passweg J, Socié G, Bacigalupo A, Franceschetto G, et al. Outcome of aplastic anemia in adolescence: a survey of the Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.



- Haematologica. 2014;99(10):1574–81.
93. Passweg JR, Socié G, Hinterberger W, Bacigalupo A, Biggs JC, Camitta BM, et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: Has outcome improved? *Blood*. 1997;90(2):858–64.
  94. Kobayashi R, Yabe H, Hara J, Morimoto A, Tsuchida M, Mugishima H, et al. Preceding immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and ciclosporin increases the incidence of graft rejection in children with aplastic anaemia who underwent allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical siblings. *Br J Haematol*. 2006;135(5):693–6.
  95. Hartung HD, Olson TS, Bessler M. Acquired Aplastic Anemia in Children. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(6):1311–36.
  96. Bacigalupo A, Giammarco S, Sica S. Bone marrow transplantation versus immunosuppressive therapy in patients with acquired severe aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2016;1–7.
  97. Kao SY, Xu W, Brandwein JM, Lipton JH, Messner HA, Minden MD, et al. Outcomes of older patients (>60 years) with acquired aplastic anaemia treated with immunosuppressive therapy. *Br J Haematol*. 2008;143(5):738–43.
  98. Passweg JR, Marsh JCW. Aplastic Anemia: First-line Treatment by Immunosuppression and Sibling Marrow Transplantation. *Hematology*. 2010;2010(1):36–42.
  99. Schrezenmeier H, Marsh J, Bacigalupo A, Du U, Franzke A, Hallek M, et al. CME article A randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia receiving antithymocyte globulin ( ATG ), cyclosporine , with or without G-CSF : a study of the SAA Working Party of the European Group for Blood and Marrow. *Blood*. 2012;117(17):4434–41.
  100. Dufour C, Svahn J, Bacigalupo a. Front-line immunosuppressive treatment of acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(2):174–7.
  101. Risitano a M, Schrezenmeier H. Alternative immunosuppression in patients failing immunosuppression with ATG who are not transplant candidates: Campath (Alemtuzumab). *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(2):186–90.
  102. Risitano AM. Immunosuppressive therapies in the management of immune-mediated marrow failures in adults: Where we stand and where we are going. *Br J Haematol*. 2011;152(2):127–40.

103. Marsh JCW. Treatment of acquired aplastic anemia. *Haematol Hematol J.* 2007;92(01):2–5.
104. Alissa HM, Counselman F, Chen SM. Serum Sickness [Internet]. MedScape. 2016 [citado 14 de Julho de 2016]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/332032-overview>
105. Rosenfeld S, Follmann D, Nunez O, Young NS. Antithymocyte Globulin and Cyclosporine for Severe Aplastic Anemia. *Jama.* 2003;289(9):1130.
106. Trcuclu A, Passweg J, Nissen C, Bargetzi M, Hoffmann T, Signer E, et al. Repeated treatment with horse antilymphocyte globulin for severe aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 1998;100(2):393–400.
107. Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50(8):1037–56.
108. Passweg JR, Aljurf M. Treatment and hematopoietic SCT in aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(2):161.
109. Bacigalupo A, Socie' G, Lanino E, Prete A, Locatelli F, Locasciulli A, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA working party. *Haematologica.* 2010;95(6):976–82.
110. George B, Mathews V, Viswabandya A, Kavitha ML, Srivastava A, Chandy M. Fludarabine and cyclophosphamide based reduced intensity conditioning (RIC) regimens reduce rejection and improve outcome in Indian patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transpl.* 2007;40(1):13–8.
111. Marsh JC, Gupta V, Lim Z, Ho AY, Ireland R, Hayden J, et al. Alemtuzumab with fludarabine and cyclophosphamide reduces chronic graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation for acquired aplastic anemia. *Blood.* 2011;118(8):2351–7.
112. Bacigalupo A, Socié G, Schrezenmeier H, Tichelli A, Locasciulli A, Fuehrer M, et al. Bone marrow versus peripheral blood as the stem cell source for sibling transplants in acquired aplastic anemia: survival advantage for bone marrow in all age groups.

- Haematologica. 2012;97(8):1142–8.
113. Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, Aljurf M, Atsuta Y, Bonfim C, et al. Recommended Screening and Preventive Practices for Long-term Survivors after Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(3):337–41.
  114. Scheinberg P, Nunez O, Weinstein B, Scheinberg P, Wu CO, Young NS. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naïve, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012;119(2):345–54.
  115. Risitano AM, Selleri C, Serio B, Torelli GF, Kulagin A, Maury S, et al. Alemtuzumab is safe and effective as immunosuppressive treatment for aplastic anaemia and single-lineage marrow failure: A pilot study and a survey from the EBMT WPSAA. *Br J Haematol*. 2010;148(5):791–6.
  116. Socie G. Outcome of pregnancy and disease course among women with aplastic anemia treated with immunosuppression Outcome of Pregnancy and Disease Course among Women with Aplastic Anemia Treated with Immunosuppression. *Ann Intern Med*. 2002;137(SEPTEMBER):164–72.
  117. Desmond R, Townsley DM, Dumitriu B, Olnes MJ, Scheinberg P, Bevans M, et al. Eltrombopag restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug. *Blood*. 2014;123(12):1818–25.
  118. Brodsky RA, Sensenbrenner LL, Jones RJ. Complete remission in severe aplastic anemia after high-dose cyclophosphamide without bone marrow transplantation. *Blood*. 1996;87(2):491–4.
  119. Tisdale JF, Dunn DE, Geller N, Plante M, Nunez O, Dunbar CE, et al. High-dose cyclophosphamide in severe aplastic anaemia: a randomised trial. *Lancet*. 2000;356(9241):1554–9.
  120. Scheinberg P, Townsley D, Dumitriu B, Scheinberg P, Weinstein B, Daphtary M, et al. Moderate-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia has significant toxicity and does not prevent relapse and clonal evolution. *Blood*. 2014;124(18):2820–3.
  121. Marsh J, Schrezenmeier H, Marin P, Ilhan O, Ljungman P, McCann S, et al. Prospective randomized multicenter study comparing cyclosporin alone versus the combination of antithymocyte globulin and cyclosporin for treatment of patients with nonsevere aplastic anemia: a report from the European Blood and Marrow Transplant (EBMT) S. *Blood*. 1999;93(7):2191–5.

122. Tichelli A, Socie G, Henry-Amar M, Marsh J, Passweg J, Schrezenmeier H, et al. Effectiveness of immunosuppressive therapy in older patients with aplastic anemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation Severe Aplastic Anaemia Working Party. *Ann Intern Med.* 1999;130(3):193–201.
123. Aitchison RGM, Marsh JCW, Hows JM, Russell NH. Pregnancy associated aplastic anaemia : a report of five cases and review of current management. *Br J Haematol.* 1989;73(4):541–5.
124. McKay DB, Josephson MA. Pregnancy in recipients of solid organs--effects on mother and child. *N Engl J Med.* 2006;354(12):1281–93.



# Relatório de Estágio Curricular do Mestrado em Análises Clínicas

Trabalho realizado no Serviço de Patologia Clínica e Imunohemoterapia (SPC/SIH) do Centro Hospitalar da Póvoa de Varzim/Vila do Conde (CHPVVC), sob orientação científica da Dr.<sup>a</sup> Alberta Cruz.

Julho de 2016

# Índice

<b>Índice de figuras.....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de tabelas .....</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>vii</b>
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
A Instituição .....	2
<i>Caracterização do Serviço de Patologia Clínica do CHPVVC .....</i>	<i>2</i>
<b>Controlo de Qualidade .....</b>	<b>6</b>
Controlo de Qualidade Interno .....	6
Controlo de Qualidade Externo .....	7
A fase pré-analítica e respetivas não-conformidades.....	7
<b>Microbiologia .....</b>	<b>9</b>
Introdução ao sector .....	9
<i>A rotina laboratorial no sector de Microbiologia.....</i>	<i>10</i>
Coloração .....	11
Exame cultural .....	12
Instrumentos automatizados em Microbiologia .....	12
<i>VITEK®2 Compact .....</i>	<i>12</i>
<i>MiniAPI®.....</i>	<i>13</i>
<i>BacT/Alert® 3D .....</i>	<i>14</i>
Pesquisa bacteriológica nos principais produtos biológicos .....	15
<i>Urina.....</i>	<i>15</i>
<i>Sangue .....</i>	<i>17</i>
<i>Secreções brônquicas e aspirado nasofaríngeo .....</i>	<i>18</i>
<i>Fezes.....</i>	<i>19</i>
<i>Exsudado vaginal ou endocervical.....</i>	<i>21</i>
<i>Líquidos biológicos normalmente estéreis.....</i>	<i>23</i>
<i>Exsudados de feridas e abscessos.....</i>	<i>23</i>
<i>Ponta de catéter.....</i>	<i>24</i>
<i>Outros produtos biológicos .....</i>	<i>24</i>
Micobacteriologia.....	24
Micologia .....	25
Virologia.....	26
Parasitologia .....	26
Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	27
<i>Técnicas utilizadas nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos .....</i>	<i>28</i>

<b>Hematologia Laboratorial e Hemostase .....</b>	<b>30</b>
Introdução .....	30
Recursos e equipamentos presentes em Hematologia Laboratorial.....	30
<i>Contadores hematológicos automáticos .....</i>	<i>30</i>
<i>Autoanalísadores das frações de Hb .....</i>	<i>32</i>
<i>Outros equipamentos disponíveis.....</i>	<i>33</i>
A rotina laboratorial em Hematologia e Hemostase .....	33
Análises efetuadas em Hematologia Laboratorial e Hemostase .....	34
<i>Hemograma completo .....</i>	<i>34</i>
<i>Estudo manual da morfologia eritrocitária, leucocitária e plaquetária .....</i>	<i>35</i>
<i>Doseamento de frações de hemoglobina.....</i>	<i>37</i>
<i>Velocidade de sedimentação .....</i>	<i>38</i>
<i>Gasimetria arterial .....</i>	<i>38</i>
<i>Contagem de células noutros líquidos biológicos .....</i>	<i>39</i>
<i>Estudo da hemostase e coagulação .....</i>	<i>40</i>
<b>Imunoquímica.....</b>	<b>43</b>
Introdução ao Sector.....	43
Análises efetuadas a soro ou plasma .....	44
<i>Sistemas automatizados .....</i>	<i>44</i>
<i>Análise de outros líquidos biológicos .....</i>	<i>61</i>
Técnicas manuais de diagnóstico.....	62
<i>Técnicas manuais de diagnóstico no soro .....</i>	<i>62</i>
<i>Técnicas manuais de diagnóstico em urina tipo II.....</i>	<i>66</i>
<i>Técnicas manuais de diagnóstico em fezes.....</i>	<i>75</i>
<b>Imunohemoterapia .....</b>	<b>78</b>
Introdução .....	78
Provas pré-transfusionais.....	78
<i>Determinação do grupo sanguíneo ABO .....</i>	<i>78</i>
<i>Determinação do grupo sanguíneo Rh .....</i>	<i>79</i>
<i>Prova de compatibilidade (cross-matching) .....</i>	<i>79</i>
<i>Provas pré-transfusionais em recém-nascidos .....</i>	<i>80</i>
Controlo de Qualidade.....	80
<b>Conclusão .....</b>	<b>81</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>82</b>

## Índice de figuras

<i>Figura 1. Fachada do CHPVVC, unidade da Póvoa de Varzim.....</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2. Tubos de colheita de soro ou plasma utilizados no Serviço de Patologia Clínica. ....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3. Amostra de urina após coloração de Gram com uma cultura polimicrobiana .....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Uma galeria API® Coryne.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5. Teste da coagulase por aglutinação em latex. ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 6. Placa de Gelose Sangue onde se efetuou o teste de sensibilidade à optoquina.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 7. Colónias sugestivas de S. agalactiae em meio Granada.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 8. Serotipagem de Streptococcus spp. pela classificação de Lancefield.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 9. Pesquisa de C. trachomatis com resultado positivo, em kit imunocromatográfico. ....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 10. Fungos leveduriformes numa amostra de urina após coloração de Gram. ....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 11. Ovo de Shistosoma haematobium, no exame a fresco de uma amostra de urina.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 12. Sequência interpretativa dos testes de suscetibilidade aos antibióticos. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 13. Exemplo de um campo microscópico de um esfregaço de sangue periférico. ....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 14. Tubos destinados à determinação da VS inseridos no respetivo equipamento.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 15. Lâmina de cyto-spin de líquido pleural, para contagem diferencial.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 16. Observação de uma lâmina de cyto-spin ao microscópio ótico .....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 17. Organização do sector de imunoquímica. ....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 18. Esquema de diagnóstico de alergias no CHPVVC. ....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 19. Algoritmo de testes no diagnóstico da doença alérgica.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 20. Exemplo de um gel de eletroforese das proteínas do soro .....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 21. Tira de teste para urina Combur® test strip .....</i>	<i>60</i>



## Índice de tabelas

<i>Tabela 1. Estirpes da ATCC utilizadas no controlo de qualidade interno em Microbiologia. ....</i>	<i>7</i>
<i>Tabela 2. Listagem dos meios de cultura e enriquecimento.....</i>	<i>12</i>
<i>Tabela 3. Cartas do equipamento VITEK 2 Compact .....</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 4. Gama de galerias API® de que o Laboratório dispõe. ....</i>	<i>14</i>
<i>Tabela 5. Indicadores de uma gasimetria arterial. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 6. Parâmetros avaliados no estudo da hemostase. ....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 7. Parâmetros determinados no Roche™ Cobas® 6000, módulo c501®. ....</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 8. Parâmetros determinados no Roche™ Cobas® 6000, módulo e601®.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 9. Parâmetros determinados no Cobas® Integra 400 plus. ....</i>	<i>50</i>
<i>Tabela 10. Parâmetros determinados no VIDAS®.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 11. Parâmetros determinados no Cobas® e411. ....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 12. Autoanticorpos detectados no Phadia™ 100 UNICAP®. ....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 13. Autoanticorpos pesquisados no screening de hepatite autoimune .....</i>	<i>65</i>

## Agradecimentos

Dedico este espaço para agradecer a todos aqueles que, ainda que em diferentes aspetos, foram fundamentais à realização do Estágio Curricular e à elaboração do presente relatório, tendo contribuído para a sua concretização.

Começo por agradecer ao Dr. Fernando Fonseca e à Dr.<sup>a</sup> Anabela Vieira e Silva por me possibilitar a realização do meu estágio, no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar da Póvoa de Varzim/Vila do Conde.

À minha orientadora, a Dr.<sup>a</sup> Alberta Cruz, o constante apoio, pelos conhecimentos transmitidos e por ter contribuído, com o seu espírito crítico, para a minha evolução como futura profissional de Análises Clínicas. Agradeço ainda a sua constante disponibilidade para me ajudar desde o primeiro dia.

A todo o pessoal do Serviço de Patologia Clínica, agradeço o facto de ter contribuído para a minha integração plena no Serviço. Em particular:

À Dr.<sup>a</sup> Carla Leite, às Dras. Olívia Pina e Paula Leite e à Dr.<sup>a</sup> Helena Rodrigues pelo apoio e aprendizagem que me proporcionaram no período em que permaneci no sector de Microbiologia, Hematologia e Imunoquímica, respetivamente.

A todas as Técnicas de Análises Clínicas, por se mostrarem sempre disponíveis para me apoiarem, deixando-me participar no seu trabalho e ensinando-me algo de novo todos os dias.

Agradeço também às pessoas fantásticas com quem tive o prazer de partilhar a experiência do Mestrado em Análises Clínicas e que sempre me acompanharam nesta fase crucial do mesmo, por serem um exemplo de companheirismo, amizade e carinho.

Aos meus amigos – os de sempre e para sempre, que sabem bem o lugar que ocupam em mim – por estarem sempre presentes, de corpo e alma, pelos momentos que vivemos, por me darem força e me lembrarem sempre do que realmente é importante.

Ao Pedro, pelo amor sem medida, e aos pais, para quem me faltam as palavras para descrever o quanto são importantes para mim.

Por último, com plena consciência do quanto o seu apoio incondicional permitiu dar ao meu percurso académico um final feliz, deixo um enorme agradecimento à minha Mãe e à minha Avó, a quem tudo devo. Agradeço ainda à família mais próxima.

A todos, o meu muito obrigada.

## Abreviaturas

<b>AES</b>	<i>Advanced Expert System®</i>
<b>ANA</b>	Anticorpos antinucleares (de <i>antinuclear antibodies</i> )
<b>aPTT</b>	Tempo de tromboplastina parcial ativada
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain-Heart Infusion</i>
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colónias (de <i>colony-forming units</i> )
<b>CHPVVC</b>	Centro Hospitalar da Póvoa de Varzim/Vila do Conde
<b>CLED</b>	<i>Cystine-Lactose Electrolyte Deficient</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CNA</b>	Colistina e ácido nalidíxico
<b>dsDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (de <i>double stranded DNA</i> )
<b>ECLIA</b>	Eletroquimioluminescência
<b>ELFA</b>	<i>Enzyme linked fluorescent assay</i>
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>FEIA</b>	Imunoensaio fluoroenzimático (de <i>fluoroenzyme immunoassay</i> )
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína (de <i>fluorescein isotyocyanide</i> )
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>Hba1c</b>	Hemoglobina glicada
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana (de <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta <i>performance</i> (de <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>Htc</b>	Hematócrito
<b>IF</b>	Fator intrínseco (de <i>intrinsic factor</i> )
<b>IFCC</b>	Federação Internacional de Química Clínica (de <i>International Federation for Clinical Chemistry</i> )
<b>INR</b>	Razão internacional normalizada (de <i>International Normalized Ratio</i> )
<b>ISE</b>	Elétrodos selectivos para iões (de <i>ion-selective electrodes</i> )
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>MCH</b>	Hemoglobina globular média (de <i>mean cell haemoglobin</i> )
<b>MCHC</b>	Concentração de hemoglobina globular média (de <i>mean cell haemoglobin concentration</i> )
<b>MCV</b>	Volume globular médio (de <i>mean cell volume</i> )

<b>MIC</b>	Concentração mínima inibitória (de <i>minimum inhibitory concentration</i> )
<b>PCA</b>	Antigénio das células parietais (de <i>parietal cell antigen</i> )
<b>PDW</b>	Coeficiente de variação de plaquetas (de <i>platelet distribution width</i> )
<b>PSM</b>	<i>Process System Management</i>
<b>PT</b>	Tempo de protrombina
<b>RBC</b>	Eritrócitos (de <i>red blood cells</i> )
<b>RDW</b>	Coeficiente de variação de eritrócitos (de <i>red cell distribution width</i> )
<b>RIQAS</b>	<i>RANDOX™ International Quality Assessment Scheme</i>
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RSV</b>	Vírus respiratório sincicial (de <i>respiratory syncytial virus</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>SS</b>	<i>Salmonella/Shigella</i>
<b>TPHA</b>	<i>Treponema pallidum haemagglutination</i>
<b>UK NEQAS</b>	<i>United Kingdom National External Quality Scheme</i>
<b>VDRL</b>	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
<b>VS</b>	Velocidade de sedimentação

## Introdução

Os meios complementares de diagnóstico e terapêutica são indispensáveis à investigação na Medicina Laboratorial, com a finalidade de suportar e viabilizar um correto diagnóstico, tratamento e prevenção da doença no indivíduo, no meio hospitalar e na comunidade que o envolve.

Os profissionais de Análises Clínicas, integrados em equipas multidisciplinares, desenvolvem a sua atividade ao nível da Patologia Clínica e Imuno-hemoterapia através do estudo, aplicação e avaliação das técnicas e métodos analíticos próprios, com fins de diagnóstico, de rastreio e de monitorização da evolução do quadro clínico do paciente. Esta atividade requer uma intensa aprendizagem, atualização e dedicação, para as quais o estágio curricular pretende despertar os futuros profissionais.

Neste contexto, este relatório tem como finalidade descrever o estágio curricular de carácter profissionalizante, realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Este estágio foi efetuado no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar da Póvoa de Varzim/Vila do Conde (CHPVVC), entre janeiro e abril de 2016 num total de 450 horas, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Alberta Cruz, Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas.

Pretendo, deste modo, reportar a atividade laboratorial realizada, em particular nas áreas de Microbiologia, Hematologia e Imunoquímica. Esta envolveu uma constante reaprendizagem, contextualização e aplicação dos conhecimentos adquiridos na formação curricular deste ciclo de estudos à realidade de um laboratório de análises clínicas em contexto hospitalar e da população da área circundante ao Hospital. Permaneci um mês em cada uma das valências mencionadas, pela referida ordem cronológica.

Para os referidos efeitos, apresento uma descrição detalhada do CHPVVC e das três valências referidas, onde faço menção aos parâmetros determinados, os respetivos métodos utilizados, a interpretação dos resultados laboratoriais e a sua importância clínica.

## A Instituição



*Figura 1. Fachada do CHPVVC, unidade da Póvoa de Varzim.*

O Centro Hospitalar da Póvoa de Varzim - Vila do Conde é constituído por duas unidades hospitalares, localizadas na Póvoa de Varzim e outra em Vila do Conde. Nestas unidades hospitalares são prestados cuidados de saúde não só à população dos respetivos concelhos, mas também a utentes de algumas freguesias vizinhas, nomeadamente de Esposende, Barcelos e Famalicão, totalizando aproximadamente 150 000 habitantes.

Concretamente, a Unidade Hospitalar da Póvoa de Varzim dispõe de Serviços de Urgência, Consulta Externa e Internamento, nomeadamente de Cirurgia, Ortopedia, Ginecologia e Obstetrícia, Pediatria, Neonatologia, Anestesiologia, Imagiologia, Nutrição e Dietética, Medicina Física e Reabilitação, Serviços Farmacêuticos e o Serviço de Patologia Clínica e Imuno-Hemoterapia, onde foi realizado o estágio. O serviço de Medicina Interna está essencialmente localizado na unidade de Vila do Conde.

### Caracterização do Serviço de Patologia Clínica do CHPVVC

O Serviço de Patologia Clínica está situado na Unidade Hospitalar da Póvoa de Varzim, no piso 0 do edifício central. Encontra-se dividido em três sectores sob a orientação do Diretor do Serviço, o Dr. Fernando Fonseca:

- Microbiologia, coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Carla Leite;
- Hematologia Laboratorial e Hemostase, coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Paula Leite e pela Dr.<sup>a</sup> Olívia Pina.
- Imunoquímica, coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Alberta Cruz e pela Dr.<sup>a</sup> Helena Rodrigues.

O serviço conta com três Patologistas Clínicos, quatro Farmacêuticas e nove Técnicas de Análises Clínicas. Conta também com a colaboração de pessoal administrativo e uma assistente operacional.

Neste serviço são realizadas as análises de amostras provenientes dos dois hospitais pertencentes ao Centro Hospitalar – concretamente, dos respetivos serviços de Urgência, Internamento e Consulta Externa.

#### *A rotina laboratorial no Serviço de Patologia Clínica do CHPVVC*

*De uma forma geral, a rotina laboratorial deste Serviço consiste nas seguintes fases fundamentais, as quais oportunamente aprofundarei relativamente a cada sector individualmente.*

##### *Colheita de amostras*

A colheita de amostras biológicas destinadas a exames laboratoriais, constitui uma das importantes etapas da fase pré-analítica.

A receção das amostras ocorre na secção administrativa do serviço, sendo verificado o preenchimento correto do pedido analítico e a identificação da amostra, sendo depois realizado o registo informático e atribuído um código de barras. A primeira abordagem ao paciente quando entra na sala de colheitas é a identificação deste, confirmando cuidadosamente o seu nome completo.

A colheita de sangue é feita por punção venosa percutânea das veias periféricas utilizando o sistema *Monovette®*, baseado no método de vácuo ou seringa. Todo este procedimento, além das condições de transporte e armazenamento das amostras e dos seus critérios de aceitabilidade ou rejeição, estão sempre em conformidade com o Manual de Colheitas do CHPVVC.

O Serviço de Patologia Clínica dispõe dos tubos de colheita de soro ou plasma figurados no esquema da página seguinte, sendo o anticoagulante e a respetiva proporção face à amostra adequada às determinações a que se destinam.

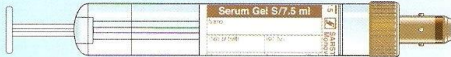

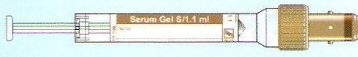



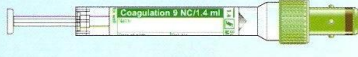
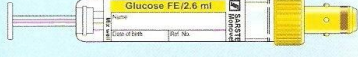
S-Monovette® 7,5 ml  01.1602.001 251281	Soro-Gel	Bioquímica Endocrinologia Imunologia Serologia Alergologia Auto-Imunidade
S-Monovette® 2,6 ml  04.1905.001 250634	Soro-Gel	
S-Monovette® 1,1 ml  06.1667.001 250641	Soro-Gel	
S-Monovette® 2,7 ml  05.1167.001 251420	EDTA K	
S-Monovette® 1,2 ml  06.1664.001 250636	EDTA K	Hemograma Hemoglobina Glicosilada
S-Monovette® 3,0 ml  05.1165.001 251300	Citrato	Estudo da Coagulação
S-Monovette® 1,4 ml  06.1668.001 250635	Citrato 1:10	
S-Monovette® 2,6 ml  04.1903.001 251361	Fluoreto	Provas de Glicose

Figura 2. Tubos de colheita de soro ou plasma utilizados no Serviço de Patologia Clínica.

#### Receção, distribuição, análise das amostras e validação de resultados

Após a receção das amostras na área administrativa e do respetivo registo informático, as amostras são enviadas ao sector ao qual se destinam, junto com as respetivas requisições, para serem oportunamente processadas pelos Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica. Os Serviços de Patologia Clínica e de Imuno-hemoterapia usam, respetivamente, o *software*



SISLAB (Sistema Integrado de Gestão Laboratorial) e SIBAS (Sistema de Gestão de Bancos de Sangue) para a receção das amostras, importação de pedidos analíticos e exportação dos resultados. A consulta de informação clínica dos pacientes é feita nas aplicações *SClínico* e/ou *Alert*.

#### *Validação de resultados*

A validação dos resultados, efetuada pelos Patologistas Clínicos e/ou Técnicos Superiores de Saúde de cada sector, tem sempre em consideração a idade, sexo, fisiopatologia e diagnóstico clínico provável e/ou definitivo, quando existe, com comparação de resultados anteriores, se existirem. Os resultados marcadamente anormais ou distintos dos anteriores para o mesmo doente, quando proveniente do Internamento ou Serviço de Urgência, devem ser confirmados com recurso a nova colheita de amostra.

Os resultados validados ficam automaticamente disponíveis no processo do doente e podem ser visualizados pelo médico prescriptor nos sistemas informáticos disponíveis para comunicação entre os Serviços Clínicos e o Serviço de Patologia Clínica.

## Controlo de Qualidade

O Serviço de Patologia Clínica tem como objetivo principal efetuar as análises clínicas sempre no sentido de satisfazer as necessidades dos seus utentes, garantindo a conformidade e a qualidade dos seus serviços. Para isso, são adotadas medidas no sentido de controlar a qualidade nas diferentes fases analíticas.

### Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno é realizado em todos os equipamentos automatizados de manhã, após o horário noturno e antes da rotina laboratorial diária, e durante o dia é repetido sempre que se justifique como, por exemplo, no caso de:

- Os resultados referentes aos controlos não cumprirem as regras de Westgard.
- Serem utilizados reagentes novos e/ou de lotes diferentes; neste caso, efetua-se em primeiro lugar uma calibração e só depois se efetua o controlo.

Os valores de controlo são registados automaticamente no sistema informático sob a forma de gráficos de Levey-Jennings, aos quais são aplicadas as regras de Westgard para verificar se será necessário aplicar medidas corretivas. Desta forma, proporciona-se uma maior fiabilidade de resultados.

O controlo de qualidade interno é também efetuado para as técnicas manuais em prática no Laboratório: são exemplos as reações para o diagnóstico de infeção por *Treponema pallidum*, ou as eletroforeses das proteínas, para assegurar regularmente que os reagentes dos respetivos kits e os equipamentos se encontram nas melhores condições de utilização.

No Sector de Microbiologia, o controlo de qualidade interno é efetuado mensalmente, no VITEK® 2 Compact, utilizando estirpes comerciais padronizadas pela American Type Culture Collection (ATCC) para garantir a qualidade de todo o processo automatizado de identificação e antibiograma.

As estirpes usadas estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Estirpes da ATCC utilizadas no controlo de qualidade interno em Microbiologia.

<b>ATCC</b> <b>29213</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>ATCC</b> <b>29212</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>ATCC</b> <b>25922</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ATCC</b> <b>27853</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>ATCC</b> <b>49247</b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<b>ATCC</b> <b>22019</b>	<i>Candida parapsilopsis</i>

### Controlo de Qualidade Externo

O Serviço de Patologia Clínica é periodicamente avaliado, a nível internacional, através da participação em programas de controlo de qualidade externo.

Este controlo visa avaliar a exatidão e precisão dos resultados, através da participação nos programas internacionais, como o *United Kingdom National External Quality Scheme* (UK NEQAS), *Randox International Quality Assessment Scheme* da *Randox™ Laboratories* (RIQAS), *External Quality Assurance Services* (EQAS) ou *OneWorld Accuracy*. Periodicamente, segundo um calendário pré-definido de entrega de amostras “cegas” e respetiva devolução dos resultados analíticos, chegam ao Laboratório amostras, provenientes das entidades acima referidas, para análise em todos os sectores, com uma breve descrição do caso clínico a que se referem e dos parâmetros que são pedidos em anexo. Após o envio dos resultados, as entidades fazem a sua análise comparativa com outros resultados obtidos pelas mesmas metodologias e equipamentos utilizados no CHPVVC, no sentido de se implementarem medidas corretivas e preventivas para a melhoria do desempenho do serviço prestado, caso seja necessário.

### A fase pré-analítica e respetivas não-conformidades

A fase pré-analítica engloba o contacto direto com o utente, a colheita e transporte da amostra biológica, a receção dos vários produtos biológicos, a fase de identificação e registo do produto e a verificação do pedido de análises.

Em boa verdade, a fase pré-analítica inicia-se antes mesmo da colheita, no momento em que o clínico efetua a requisição analítica. Assim, é de ter em conta que uma análise deve

ser requerida considerando a história clínica e o(s) diagnóstico(s) base prováveis e prevalentes.

Não deve ser ainda esquecida a possibilidade de interferência por parte de alimentos, fármacos, hábitos de vida do paciente, hora da colheita, entre outros fatores.

A colheita de amostras biológicas destinadas a exames laboratoriais constitui uma das mais importantes etapas da fase pré-analítica. A maior percentagem de erros surge nesta fase, uma vez que uma colheita mal efetuada é muitas vezes a causa de resultados inexatos e imprecisos.

No sentido de assegurar a qualidade dos resultados analíticos, devem ser rejeitadas, logo no momento da respetiva chegada ao Serviço, as amostras em que se verifique uma ou mais das seguintes não conformidades administrativas:

- Discordância das requisições analíticas com os produtos enviados.
- Identificação inadequada ou ausente da amostra.
- Preenchimento incorreto ou ilegível da requisição.
- Uso de tubo de colheita inadequado à análise e/ou produto biológico.
- Inadequada quantidade de volume de amostra colhido.
- Produto com transporte incorreto ou com produtos biológicos extravasados.
- Más condições de armazenamento.

No entanto, é possível ainda que ocorram outro tipo de não conformidades, sendo as mais comuns:

- Amostras de sangue hemolisado.
- Amostras de sangue coagulado.
- Volume insuficiente de amostra para efetuar todas as análises requeridas.
- Falta de informação e/ou assinatura médica.
- Incumprimento das normas de colheita.

Assim se confirma a importância de a colheita de amostras ser efetuada com a maior correção e cuidado, de modo a minimizar os erros analíticos e de diagnóstico.

# Microbiologia

Janeiro de 2016

## Introdução ao sector

No sector de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica são realizadas análises bacteriológicas, virológicas, parasitológicas e micológicas, permitindo o diagnóstico de infeções com diferentes etiologias.

O diagnóstico é efetuado a partir de diferentes tipos de **amostras biológicas**, nomeadamente urina, fezes, hemoculturas, expetoração, aspirados brônquicos, nasofaríngeos ou gástricos, zaragatoas de exsudados vaginais, nasais, oculares, auriculares e de feridas ou abscessos, líquido cefalorraquidiano (LCR) e outros líquidos biológicos, pus, biópsias, exsudados de feridas ou abscessos e pontas de cateter ou escova.

Para além do isolamento e identificação do(s) organismo(s) patogénico(s) responsável(is) pela infeção, são também realizados antibiogramas (ou testes de sensibilidade aos antibióticos), que permitem determinar quais os antibióticos que poderão ser administrados ao paciente e detetar eventuais estirpes multirresistentes provenientes do meio hospitalar ou da comunidade, sendo algumas delas designadas por “estirpes alerta”.

Este sector dispõe dos seguintes sistemas automatizados:

- Um aparelho que permite a identificação de estirpes microbiológicas e respetivo antibiograma, o **VITEK®2 Compact** da BioMérieux™, utilizando cartas de identificação e de antibiograma.
- Dois módulos **BacT/Alert®3D** da BioMérieux™: um módulo que permite a deteção de crescimento bacteriano nas hemoculturas, de espécies aeróbias, anaeróbias e outro exclusivamente para a deteção de micobactérias
- Um sistema semi-automatizado para as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen, o **PolyStainer**.
- Um **MiniAPI®** da BioMérieux™, um aparelho que permite a identificação e antibiograma através da interpretação dos resultados dos testes efetuados nas galerias API.

Dispõe ainda de uma câmara de fluxo laminar, uma centrífuga, quatro estufas incubadoras – três delas a 37°C (uma destas exclusivamente para incubar os meios Lowenstein-Jensen para crescimento de micobactérias, outra estufa para incubar produtos em aerobiose e outra para produtos em anaerobiose e ambiente rico em CO<sub>2</sub>) e uma a 42°C para secar as lâminas antes de corar e para incubar estirpes de *Campylobacter* spp. em microaerofilia –

frigoríficos, arcas congeladoras, um microscópio ótico e um microscópio de fluorescência, estando estes localizados junto ao sector de Hematologia.

#### A rotina laboratorial no sector de Microbiologia

A rotina laboratorial começa logo no início do dia, com a avaliação dos **resultados do exame cultural** – isto é, das placas semeadas e incubadas no dia anterior - realizada pelo Técnico Superior e/ou Patologista Clínico responsável pelo sector, e que determinará a sequência de testes a realizar pelo Técnico de Diagnóstico e Terapêutica responsável no sector nesse dia – as **sementeiras** e repicagens dos vários produtos, provas de **identificação**, testes de **suscetibilidade** e **coloração** de lâminas. Entretanto, são também processados os produtos biológicos que dão entrada no Serviço nesse dia, para que sejam oportunamente analisadas:

1. O Técnico de Diagnóstico e Terapêutica confere atentamente as requisições e verifica se a colheita da amostra, a identificação do doente e do produto biológico e as análises requeridas estão corretas.
2. Procede-se à sementeira dos produtos, dentro da câmara de fluxo laminar.  
Caso alguma amostra não possa ser processada de imediato ou se tratem de amostras para pesquisa de micobactérias, são guardadas no frigorífico, em recipiente marcado para as amostras de Microbiologia, e processadas logo que possível.
3. As placas ou tubos após sementeira são colocadas nas respetivas estufas.
4. As amostras excedentes são guardadas no frigorífico até as respetivas análises microbiológicas estarem completas.

## Coloração

As colorações vulgarmente utilizadas no apoio à identificação microbiana são as colorações de **Gram** e **Ziehl-Neelsen**, sendo as lâminas coradas no sistema *PolyStainer*.

A coloração de Gram, a base de orientação da identificação de bactérias e fungos, é efetuada em todas as amostras (exceto quando se destinam unicamente a rastreio de *Streptococcus agalactiae* em grávidas).

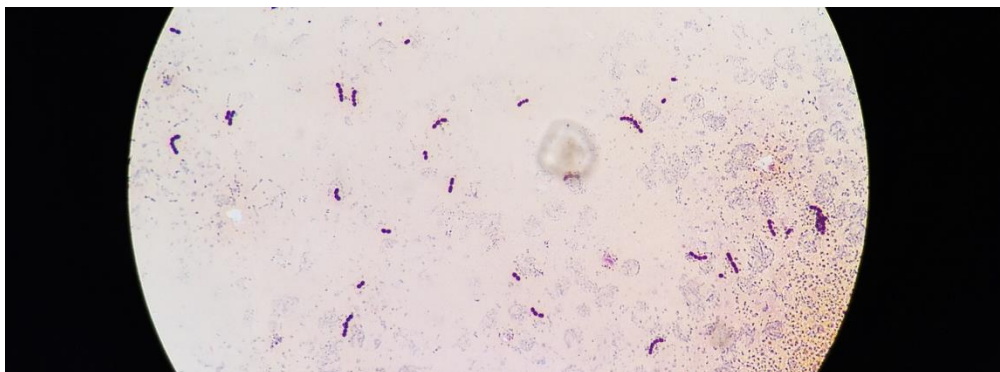


Figura 3. Amostra de urina após coloração de Gram, com uma cultura polimicrobiana, à ampliação de 1000x.

Após observação do esfregaço corado por Gram, deve ser especificada a morfologia de bactérias (cocos/bacilos/cocobacilos, Gram positivos ou negativos), fungos leveduriformes e hifas e respetivo predomínio. Devem também ser reportadas, caso se observem, células epiteliais e polimorfonucleares. Nas amostras de expetoração, às últimas é efetuada ainda uma avaliação semi-quantitativa da presença de células epiteliais e polimorfonucleares.

Em todas as amostras de secreções brônquicas, tal como em qualquer amostra que chegue ao Serviço de Patologia Clínica com informação de suspeita de infeção por micobactérias (bacilos álcool-ácido resistentes), procede-se também à coloração de Ziehl-Neelsen para a sua deteção.

## Exame cultural

O laboratório dispõe de uma grande variedade de meios de cultura e de enriquecimento líquidos e sólidos não-seletivos, seletivos e diferenciais para o exame cultural microbiológico, que se apresentam na tabela seguinte.

*Tabela 2. Listagem dos meios de cultura e enriquecimento utilizados no Sector de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do CHPVVC.*

Meios de enriquecimento	Meios sólidos		
	Não seletivos	Seletivos	Diferenciais
Selenito F	Gelose Sangue	Gelose CNA	CLED
Schaedler	Gelose Chocolate	<i>Gardnerella</i>	Granada
Todd-Hewitt	Müeller-Hinton	Gelose Chapman	
Lowenstein-Jensen		MacConkey	
<i>Brain-Heart</i> (BHI)		<i>Salmonella/Shigella</i> (SS)	
		Campylosel	
		Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol	

## Instrumentos automatizados em Microbiologia

A introdução dos sistemas automatizados, anteriormente enumerados, na determinação e apoio à interpretação de resultados veio tornar as análises mais rápidas e eficazes, permitindo o envio atempado dos resultados ao corpo clínico, melhorando significativamente o diagnóstico, prognóstico e quadro clínico geral do paciente.

### VITEK®2 Compact

Este aparelho automatizado permite a identificação de estirpes microbiológicas e respetivo antibiograma em poucas horas. O aparelho inclui: uma câmara de enchimento de cartas por vácuo, uma zona de selagem das cartas e uma zona de incubação e leitura automática de cartas (por turbidimetria e colorimetria) e o *software Advanced Expert System™ (AES)*, e base de dados que analisa e interpreta os dados enviados pelo sistema de leitura do aparelho.

O *VITEK®2 Compact* usa pequenas cartas em plástico, com numerosos poços contendo soluções de 30 µL do substrato ou antibiótico a testar numa suspensão do isolado de densidade padronizada, constituindo assim um modo miniaturizado de efetuar estes testes. Ao longo do tempo de incubação, o aparelho efetua monitorização turbidimétrica cíclica e repetitiva do crescimento bacteriano em cada teste.

As **cartas** utilizadas são específicas para identificação ou antibiograma e em função do grupo de microrganismos a que se destina. Cada carta de identificação possui poços que



contêm substratos bioquímicos desidratados. Por outro lado, as cartas de antibiograma baseiam-se no teste de microdiluição dupla para determinação da MIC. Não são necessários reagentes adicionais, pelo que se elimina deste modo o risco de erro ou contaminação. Há uma grande variedade de cartas disponíveis, sendo que o Sector de Microbiologia utiliza os mais relevantes no meio hospitalar, que efetuam o *screening* ao maior número de resistências:

Tabela 3. Cartas do equipamento VITEK 2 Compact utilizadas no Sector de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica.

Código	Microrganismos a que se destina
Cartas de Identificação	
<b>GN</b>	Bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores
<b>GP</b>	Gram-positivos
<i>Baseiam-se na utilização da fonte de carbono e na atividade enzimática para a identificação</i>	
<b>YST</b>	Fungos leveduriformes
<i>Baseia-se na utilização da fonte de carbono e azoto e na atividade enzimática.</i>	
<b>NH</b>	Géneros <i>Neisseria</i> spp. e <i>Haemophilus</i> spp. (microrganismos fastidiosos)
Cartas de Antibiograma	
<b>N192</b>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<b>N222</b>	Bacilos não fermentadores, oxidase-positivos, como <i>Pseudomonas</i> spp.; também usada para estirpes multirresistentes.
<b>P586</b>	<i>Enterococcus</i> spp.
<b>P619</b>	<i>Staphylococcus</i> spp.
<b>STo1</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus viridans</i>
<b>YS07</b>	Fungos leveduriformes – sensibilidade a antifúngicos

#### MiniAPI®

O MiniAPI destina-se à interpretação dos resultados das galerias de testes bioquímicos miniaturizados API® de forma computadorizada, fornecidos ao computador por leitura visual (permitindo a interpretação assistida após introdução do perfil bioquímico resultante no computador) ou automática (por turbidimetria ou colorimetria).

As galerias API® compreendem uma vasta gama de testes enzimáticos miniaturizados em pequenas cúpulas de teste com meio reacional desidratado, ao qual se adiciona uma suspensão do inóculo e um reagente adicional, se necessário. São utilizadas quando a identificação ou antibiograma não pode ser realizado no equipamento mais automatizado, o VITEK®2 Compact, ou para confirmar os resultados que este último tenha fornecido.



Figura 4. Uma galeria API® Coryne.

O Laboratório dispõe das galerias API® para identificação (API® ID) e antibiograma (API® ATB) enumeradas na tabela abaixo.

Tabela 4. Gama de galerias API® de que o Laboratório dispõe.

Microrganismos a que se destina	
Galerias de identificação	
API® Campy	<i>Campylobacter</i> spp.
Rapid ID 32 A	Microrganismos anaeróbios
Rapid ID 32 E	Bacilos Gram negativos
Rapid ID 32 Strept	<i>Streptococcus</i> spp.
API® NH	<i>Neisseria</i> spp., <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Moraxella catarrhalis</i>
API® Coryne	Bactérias corineformes ( <i>Corynebacterium</i> )
Galerias de antibiograma	
ATB Strep	<i>Streptococcus</i> spp.
ATB HAEMO	<i>Haemophilus</i> spp.
ATB ANA	Anaeróbios estritos

O laboratório dispõe ainda de numerosos discos e tiras de E-test para a execução de antibiogramas manuais.

### BacT/Alert® 3D

O BacT/Alert® 3D é um equipamento modular de detecção de crescimento microbiológico em **hemoculturas** e de pesquisa de **micobactérias** por colorimetria, sendo que o Laboratório dispõe de um módulo para cada uma destas finalidades.

As amostras são inseridas no equipamento em garrafas contendo meio de cultura estéril. Nesta fase de inoculação da amostra nas garrafas destinadas a este equipamento, os possíveis microrganismos aí presentes iniciam uma fase de adaptação ao meio de cultura (designada *lag phase*), após a qual este despoleta uma fase de crescimento exponencial, a *log phase*, em que ocorre produção de CO<sub>2</sub>. A mudança de cor de cinza para amarelo na presença de CO<sub>2</sub>, produzido por microrganismos presentes na amostra, é monitorizada por

colorimetria a cada dez minutos através dum sensor designado *Liquid Emulsion Sensor (LES)* presente no fundo de cada garrafa, cuja mudança de cor é despoletada pela mudança de pH.

## Pesquisa bacteriológica nos principais produtos biológicos

### Urina

As amostras de urina que chegam ao Sector de Microbiologia destinam-se maioritariamente à pesquisa bacteriológica e micológica através do exame cultural em meio CLED e/ou Sabouraud e execução de lâmina para coloração de Gram.

Em alguns casos, é pedido ao Laboratório que proceda à deteção de antígenos de *Streptococcus pneumoniae* e/ou *Legionella* spp., ambas efetuadas em *kit* imunocromatográfico de deteção rápida.

A pesquisa microbiológica na urina permite a deteção dos agentes patogénicos do trato urinário mais frequentes na comunidade e no meio hospitalar, nomeadamente:

- *Escherichia coli* (e outros bacilos Gram negativos)
- *Staphylococcus aureus* e *saprophyticus*
- *Enterococcus* spp.
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*

A amostra é inoculada por estriação central com ansa de 1 µL em meio CLED e incubada de 24 até 48 horas a 37°C em aerobiose, período após o qual se avalia quantitativamente o crescimento microbiológico. Para além do exame cultural, procede-se também à execução de uma lâmina para coloração de Gram. Esta tem como principal finalidade avaliar a qualidade da amostra, facilitando o diagnóstico de uma infeção do trato urinário – uma boa amostra, neste contexto, terá poucas ou nenhuma células epiteliais.

A valorização dos resultados deve ter em consideração:

- O método de colheita da urina: urina ocasional, punção de catéter urinário, punção suprapúbica, recolha de saco coletor pediátrico.
- A história clínica e a proveniência do doente (serviço ambulatorio ou internamento hospitalar).
- A observação microscópica do sedimento urinário.
- Resultados anteriores, se existirem.

A amostra positiva deve resultar preferencialmente numa cultura pura ou, excecionalmente polimicrobiana, desde que, neste caso, apresente uma espécie microbiológica predominante

que exclua a contaminação pela flora microbiana do aparelho urogenital. Neste último caso, devem ser devidamente isoladas, sempre que possível, todas as espécies microbiológicas nos meios mais apropriados – isto é, espécies Gram-negativas em MacConkey, Gram-positivas em Gelose Sangue e fungos em Sabouraud.

O aparecimento de colónias sugestivamente **Gram negativas** coloca a hipótese da presença de *Escherichia coli* – o agente patogénio mais comum - ou outros bacilos como *Proteus spp*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*. Perante colónias Gram negativas e **fermentadoras da lactose** procede-se diretamente à identificação e antibiograma através do sistema automatizado.

Já o aparecimento de colónias **Gram negativas e não fermentadoras da lactose** determinam a realização do teste da oxidase para detetar a possível presença de *Pseudomonas aeruginosa*, pois esta é oxidase-positiva. Neste caso, é selecionado um antibiograma adaptado a este microrganismo, utilizando a carta NO222.

Por outro lado, o aparecimento de colónias sugestivas de cocos **Gram positivos** determina a execução do teste da catalase em lâmina. Sendo positivo, indica a presença de *Staphylococcus spp.* Em seguida, efetua-se o teste da coagulase.

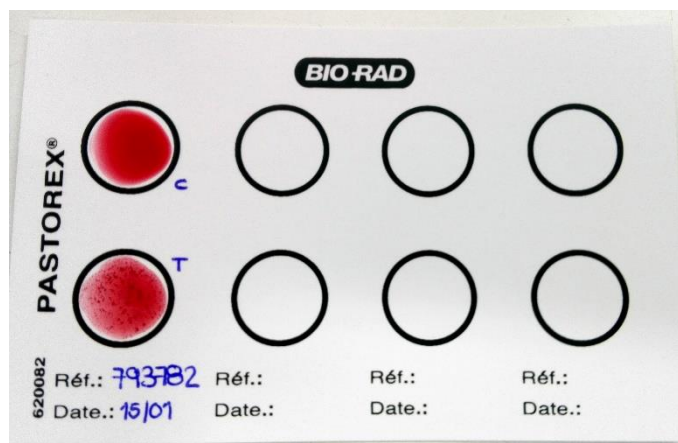


Figura 5. Teste da coagulase por aglutinação em latex: controlo negativo (C) e um resultado positivo, compatível com *S. aureus* (T).

- *Staphylococcus aureus* é coagulase-positiva – conclui-se assim a identificação, prosseguindo-se para o antibiograma.
- *Staphylococcus saprophyticus* é coagulase-negativa e resistente à novobiocina, cujo teste de sensibilidade permite suspeitar da presença desta espécie. Caso seja uma espécie de *Staphylococcus spp.* sensível à novobiocina, considera-se que se trata de um contaminante, irrelevante a nível clínico.

Caso sejam colónias catalase-negativas, sugestivas de *Streptococcus spp.*, procede-se diretamente à identificação e antibiograma através do sistema automatizado, com as cartas

GP e também P586, pois *Enterococcus* spp. são os cocos que mais frequentemente surgem no trato urinário.

No meio de CLED é apenas valorizado o crescimento igual ou superior a  $10^5$  CFU/mL, com exceção a:

- Amostras colhidas por punção suprapúbica, em que qualquer quantidade de crescimento microbiológico que surja é de valorizar.
- Doentes em antibioterapia de início prévio à colheita da amostra podem apresentar crescimento microbiológico reduzido, mas ainda assim de valorizar clinicamente.

A análise microbiológica, em conjunto com a análise bioquímica da urina e observação microscópica do sedimento urinário determinarão assim a valorização clínica do exame cultural.

### Sangue

Muitas doenças infecciosas que exigem internamento hospitalar cursam com bacteriemia transitória, intermitente ou persistente, causada por agentes patogénicos da comunidade ou nosocomiais, colocando em risco o quadro clínico e prognóstico do paciente. Tratando-se de um líquido biológico fisiologicamente estéril, normalmente o isolamento de microrganismos em mais de duas amostras de hemocultura do mesmo paciente é de valorizar, desde que tenham sido colhidas em braços diferentes, ou em atos de colheitas separados.

Normalmente, é efetuada colheita de três amostras por paciente (duas em aerobiose e uma em anaerobiose) para garrafas contendo meios de enriquecimento nutricional, incubadas a 35°C em equipamento de **hemocultura** automatizado. Este equipamento deteta crescimento bacteriano nestas amostras, quando ocorre a produção de dióxido de carbono e, conseqüentemente, alteração do pH no seu interior. Se houver deteção de crescimento, a amostra é inoculada em meio sólido (Gelose Sangue ou Gelose Chocolate) e é efetuado um esfregaço para coloração de Gram, para possibilitar o respetivo isolamento, identificação e antibiograma. É de referir que algumas espécies são valorizáveis mesmo crescendo apenas numa amostra, dada a sua elevada patogenicidade – são exemplos *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, bacilos Gram-negativos, entre outras.

Na presença de colónias de *Staphylococcus* spp.. realiza-se o teste da catalase e da coagulase: se ambos forem positivos, indiciam *Staphylococcus aureus*, devendo proceder-se ao antibiograma. Sendo o teste da coagulase negativo, será uma espécie de *Staphylococcus* coagulase-negativa. Se esta última surgir apenas numa hemocultura do mesmo paciente, trata-se de um contaminante, não sendo de valorizar. Se ocorrer crescimento em mais que uma hemocultura, procede-se à identificação e antibiograma,

nomeadamente quando estamos na presença de *Streptococcus* spp. ou bacilos Gram-negativos.

Se o aspeto em cultura das colónias não for típico de nenhum patógeno conhecido, a coloração de Gram, sempre realizada nas hemoculturas com crescimento microbiológico detetado, e a identificação e antibiograma automatizados permitirão obter mais informações acerca do microrganismo em causa.

A maior parte dos isolados clinicamente relevantes revelam crescimento após um a dois dias de incubação, exceto se se tratarem de microrganismos anaeróbios ou fungos.

### Secreções brônquicas e aspirado nasofaríngeo

As amostras de secreções brônquicas, do trato respiratório inferior, são observadas ao microscópio ótico após coloração de Gram e de Ziehl-Neelsen, e procede-se ao exame cultural por sementeira em meio de Gelose Sangue e Gelose Chocolate - que permanecem 24 a 48 horas, a 37°C, em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> - e MacConkey – que permanece a 37°C, durante 24 a 48 horas, em atmosfera aeróbia. Faz-se ainda a descontaminação da restante flora microbiana presente na amostra para a pesquisa de micobactérias, quando solicitada pelo clínico ou quando se observarem bacilos álcool-ácido resistentes na coloração de Ziehl-Neelsen.

A coloração de Gram tem como objetivo ajudar na identificação pelo exame cultural e avaliar a qualidade da amostra. Deste modo, uma amostra com flora muito diversificada, sem leucócitos e com grande quantidade de células epiteliais pavimentosas da orofaringe será de fraca qualidade neste contexto – nestas circunstâncias, se o doente estiver internado, será adequado solicitar uma nova amostra. De notar que estas amostras exigem a quantificação de leucócitos e células epiteliais por campo (em níveis de < 10, 10-25, 25-50, >50).

A coloração de Ziehl-Neelsen tem como objetivo a pesquisa de micobactérias.

Nestas amostras, são de especial relevância o predomínio de:

- *Streptococcus pneumoniae*

Apresentam-se como colónias Gram positivo, α-hemolíticas e catalase-negativas, que crescem em Gelose Sangue. A coloração de Gram revela diplococos Gram positivos. O teste de sensibilidade à optoquina produzirá um halo de inibição superior a 12 mm, dado ser uma espécie que *lhe* é sensível. A sensibilidade aos antimicrobianos deve ser estudada uma vez efetuada a identificação.

- *Staphylococcus aureus*

São colónias amareladas em Gelose Sangue, catalase e coagulase-positivas. Deve complementar-se a identificação e antibiograma.

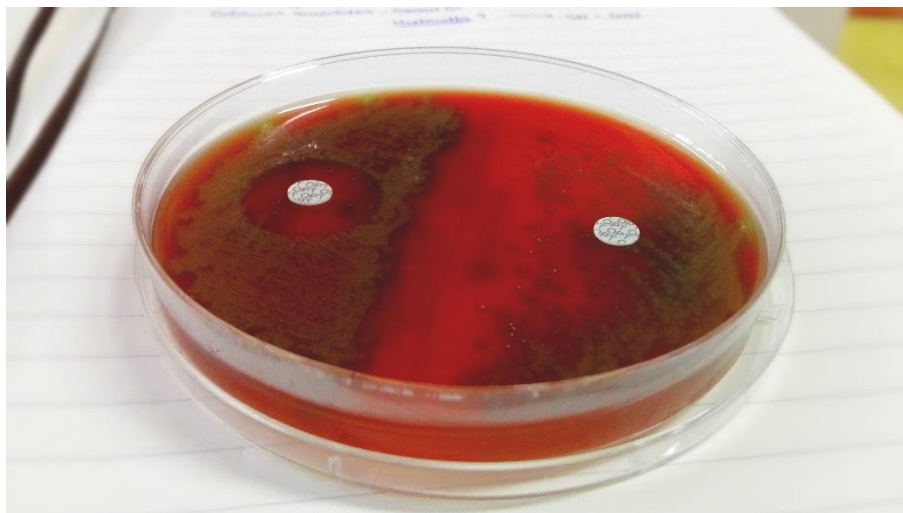


Figura 6. Placa de Gelose Sangue onde se efetuou o teste de sensibilidade à optoquina. À esquerda, uma colónia sensível - trata-se de *S. pneumoniae* - e à direita, uma colónia resistente.

- *Haemophilus influenzae*  
Crescem apenas em Gelose Chocolate, e são colónias cinzentas achatadas e opacas. A coloração de Gram evidencia-as como cocobacilos Gram negativos. Devem ser diferenciadas de *Moraxella catarrhalis* através do teste dos fatores X, V e X+V em meio de Müeller-Hinton - devem crescer apenas em redor do disco com ambos os fatores.
- *Pseudomonas aeruginosa*  
São Gram negativas, lactose-negativas e oxidase-positivas, produzindo colónias de aspeto metálico ou brilhante e com cheiro muito característico em meio MacConkey.
- Outros bacilos Gram-negativos, como *Klebsiella pneumoniae* – colónias de aspeto mucoide, lactose-positivas.

O isolamento de fungos nestas amostras é geralmente causado por contaminação da flora comensal, pelo que nem sempre é valorizada. No entanto, recém-nascidos prematuros e/ou de baixo peso ao nascimento e indivíduos imunodeprimidos estão suscetíveis a infeção de carácter muito invasivo por *Candida albicans*., *Aspergillus* spp., pelo que devem ser identificadas e relatadas ao clínico. No caso de se observar o crescimento de fungos filamentosos, estes são identificados por observação microscópica, após cultura em *slide* de fungos.

## Fezes

As infeções do aparelho gastrointestinal são prevalentes na comunidade, causando um elevado grau de morbilidade em crianças e idosos.

As coproculturas devem ser efetuadas em meio líquidos de enriquecimento (Selenito F) e meios sólidos – MacConkey, SS e, em crianças, também no meio de *Campylobacter* para a

pesquisa deste género bacteriano. Este meio necessita de estar durante 48 a 72 horas, a 42°C, em atmosfera microaerófila (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 85% N<sub>2</sub>). As colónias de *Campylobacter* spp. apresentam um aspeto muito característico na coloração de Gram – pequenos bacilos curvos, Gram negativos – o que orienta a sua identificação nesse sentido. Deste modo, faz-se a identificação através da galeria de testes bioquímicos API® *Campy* e o teste de sensibilidade aos antibióticos através do método de difusão de discos em placa. Aos meios de enriquecimento (Selenito-F), após 12 a 24 horas de incubação, devem ser efetuadas repicagens para meio SS e MacConkey. As colónias de *Salmonella* spp. são não-fermentadoras de lactose e produtoras de H<sub>2</sub>S, apresentando-se transparentes e normalmente com um aspeto enegrecido no centro – são então repicadas para o meio de Kligler, usado para confirmar a sua identificação, tornando-o também negro na zona estriada ao centro. É também efetuado o teste da urease – as colónias de *Salmonella* spp. são urease-negativas, pois não degradam a ureia.

Para confirmar a identificação de *Salmonella* spp. e determinar o serotipo de que se trata, utilizam-se soros anti-*Salmonella* para aglutinação em lâmina, baseados no esquema Kauffman-White: específicos para os inúmeros antígenos somáticos (O) e flagelados (H) que atualmente existem. Determina-se assim o serotipo, utilizando:

- Soros polivalentes para os antígenos O e H, para orientar a identificação serológica
- Soros monovalentes O e H, para determinar a fórmula antigénica que permitirá obter a identificação serológica definitiva.

As estirpes de *Salmonella* spp. não identificáveis no Laboratório são enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

As espécies de *Shigella* spp. são identificadas também através de soros, sendo que se utilizam:

- Soros polivalentes, para os subgrupos A a D.
  - Subgrupo A: *S. dysenteriae*
  - Subgrupo B: *S. flexneri*
  - Subgrupo C: *S. boydii*
  - Subgrupo D (soro misto): *S. sonnei*
- Soros monovalentes, para *S. dysenteriae*.

Outros agentes patogénicos conhecidos do trato gastrointestinal, como a *Escherichia coli* enteropatogénica e *Yersinia* spp. só são devidamente pesquisados se essa pesquisa for expressamente requerida pelo clínico. A pesquisa de *Clostridium difficile* passa pela pesquisa dos respetivos antígenos e anticorpos através de um *kit* rápido de deteção por imunocromatografia.



### Exsudado vaginal ou endocervical

As infecções do trato genitourinário feminino podem ser causadas por agentes patogénicos ou pela proliferação desregulada da flora comensal microbiana, ativadas por desequilíbrios na mesma. Do trato genital feminino fazem parte lactobacilos, difteroides, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus* coagulase-negativos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus*  $\alpha$  e  $\beta$  hemolíticos, *Escherichia coli* e leveduras.

Para o exame cultural, semeia-se o produto em Gelose Sangue, Gelose Chocolate, meio de *Gardnerella*, Sabouraud e MacConkey. Concretamente:

- No meio de Gelose Chocolate pesquisa-se a presença de *Neisseria gonorrhoeae*.
- No meio de Gelose Sangue pesquisa-se a presença de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*.
- No meio Sabouraud pesquisam-se fungos leveduriformes.

As colónias de *Gardnerella* spp. apresentam-se com  $\beta$ -hemólise, pelo que colónias com  $\alpha$ -hemólise não são de valorizar no meio específico para este género bacteriano.

Também se pesquisa a presença de *Trichomonas vaginalis*, através de exame direto microscópico.

### Rastreio de *Streptococcus agalactiae* em grávidas

Nas mulheres grávidas, nomeadamente no terceiro trimestre de gestação, é requerido este rastreio pelo serviço de Obstetrícia. A grande importância da deteção de *Streptococcus agalactiae* (que, neste caso, culmina na pesquisa do antígeno do *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico do grupo B de Lancefield) deve-se ao risco que esta bactéria representa, quando presente na flora vaginal e no colo do útero, poder ser responsável por sépsis neonatal.

Esta pesquisa é efetuada em exsudado vaginal, cujo exame cultural se faz através de sementeira em meios de enriquecimento (Todd-Hewitt) e seletivos (meio de Granada). Após 24 horas, se não houver crescimento de colónias suspeitas no meio de Granada, o meio de Todd é repicado para o meio de Gelose CNA; caso contrário, as colónias suspeitas (colónias cor de laranja) são repicadas para CNA. No dia seguinte, faz-se a pesquisa dos antígenos do grupo B de Lancefield.



Figura 7. Colônias sugestivas de *S. agalactiae* em meio Granada.

Apenas as colônias  $\beta$ -hemolíticas têm interesse serem identificadas, pelo que a estas é efetuado o teste da catalase. Se o teste da catalase se revelar negativo, trata-se então de uma espécie de *Streptococcus* spp., pelo que se efetua a serotipagem através de um *kit* de aglutinação em partículas de latex.

Dado que se trata de um rastreio, apenas tem interesse reportar ao clínico a deteção ou não de *Streptococcus agalactiae*.

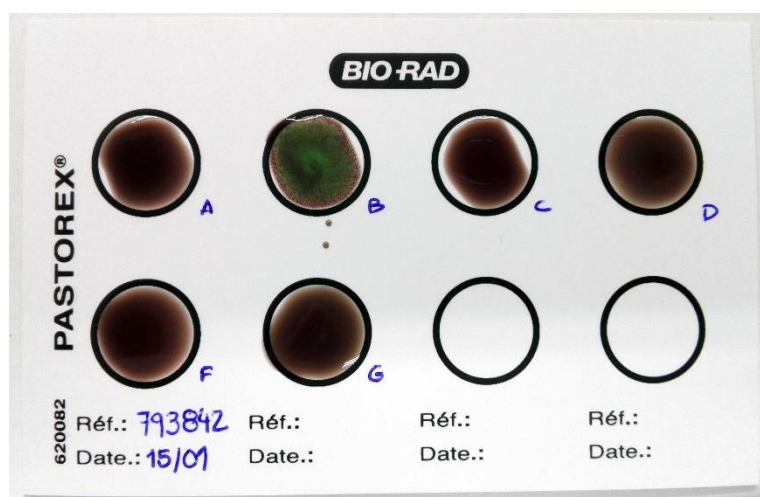


Figura 8. Serotipagem de *Streptococcus* spp. pela classificação de Lancefield. Os serotipos encontram-se assinalados, sendo a amostra representada positiva para *Streptococcus* do grupo B.

#### *Pesquisa de Chlamydia trachomatis*

Nas amostras de exsudado endocervical é efetuada ainda, caso seja requerida, a pesquisa antigénica do lipopolissacarídeo específico de *Chlamydia trachomatis* em *kit* imunocromatográfico. Este método revela-se muito útil ao diagnóstico, dada a sua acessibilidade de execução, alta especificidade e uma boa sensibilidade.

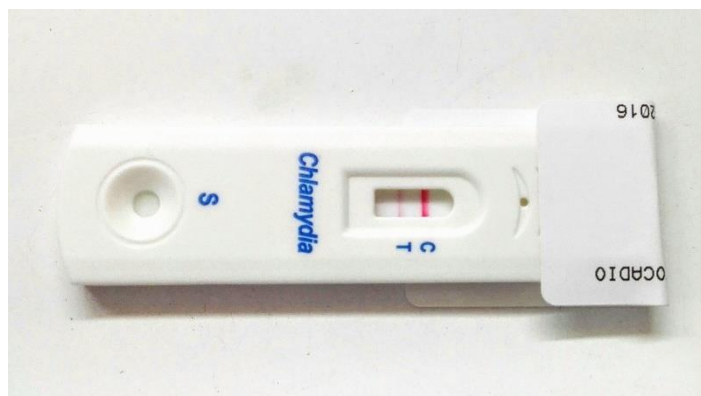


Figura 9. Pesquisa de *C. trachomatis* com resultado positivo, em kit imunocromatográfico.

### Líquidos biológicos normalmente estéreis

Entre os líquidos biológicos fisiologicamente estéreis que chegam ao Serviço de Patologia Clínica para pesquisa microbiológica figuram o LCR, líquido ascítico, líquido peritoneal, líquido pleural e líquido sinovial.

A estas amostras, o exame cultural é efetuado semeando-as em meio de **enriquecimento** (normalmente, o meio BHI) e meios sólidos: Gelose Sangue e Gelose Chocolate. É ainda corada uma lâmina pela coloração de Gram (e também Ziehl-Neelsen, no caso de se tratar de líquido pleural) para observação ao microscópio ótico.

Haja ou não turvação visível do(s) meio(s) de enriquecimento, este(s) deve(m) ser repicado(s) nos meios sólidos anteriormente referidos: caso haja turvação após 24 horas e após 48 horas, no caso de não se observar turvação do meio de enriquecimento. Executa-se sempre uma lâmina para coloração de Gram.

Nas amostras de LCR, é efetuada ainda a pesquisa de antígenos de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* e *Neisseria meningitidis*, os agentes causadores de meningite mais frequentes, através de kit aglutinação em latex.

### Exsudados de feridas e abscessos

As zaragatoas de exsudados de feridas ou abscessos semeiam-se nos meios de Gelose Sangue, Gelose Chocolate, MacConkey e ainda nos meios de enriquecimento BHI e Schaedler.

Se a amostra chegar em meio de transporte próprio para colheita em **anaerobiose**, é ainda semeada em meio Schaedler líquido e sólido, sendo o último acondicionado em atmosfera de anaerobiose. Para este efeito, utiliza-se sacos transparentes, estanques, geradores de atmosfera controlada, as *GENbag* ou *GENbox* BioMérieux™, onde se incubam desde meios de cultura a galerias de identificação API® específicas para microrganismos anaeróbios.

### Ponta de catéter

Os catéteres, apesar de essenciais à administração de fluidos e fármacos ao doente, são uma potencial via de entrada de perigosos agentes patogénicos, que a partir daí facilmente atingem a circulação sanguínea. De facto, estas infeções são das mais graves complicações no estado de saúde do doente que podem ocorrer, constituindo uma grande causa de morbilidade e mortalidade e de prolongamento do tempo de internamento.

Entre os agentes patogénicos mais comuns destas infeções encontram-se as bactérias do género *Staphylococcus* spp. coagulase-negativas, bacilos Gram-negativos e ainda o fungo leveduriforme *Candida albicans*.

O método usado no exame cultural deste produto biológico é semiquantitativo – trata-se da técnica de rolamento, que consiste em fazer a ponta do cateter rolar sobre si mesma na superfície da Gelose Sangue e deixar o meio a incubar cerca de 24 horas. É de valorizar qualquer cultura com > 15 CFU.

### Outros produtos biológicos

Podem ainda dar entrada no Sector de Microbiologia amostras de exsudados ou pus de feridas e abscessos, exsudados auriculares e oculares ou ainda biópsias de tecidos sólidos.

As feridas são, por excelência, uma via de entrada de microrganismos que podem causar infeções com grande risco de virem a atingir proporções sistémicas, nomeadamente em meio hospitalar.

As **amostras purulentas** são semeadas em Gelose Sangue, Gelose Chocolate, MacConkey e Sabouraud, de modo a abranger o possível crescimento do maior número de agentes patogénicos possível.

Caso estas amostras venham acondicionadas em meio de transporte adequado à pesquisa de microrganismos anaeróbios, são também semeadas em meio Schaedler líquido e sólido.

As **biópsias** de tecidos sólidos, após maceradas em almofariz esterilizado, são inoculadas nos mesmos meios sólidos e ainda no meio líquido de enriquecimento BHI, que é posteriormente repicado nos meios sólidos.

Nos exsudados nasais faz-se também a pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA).

### Micobacteriologia

As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes, aeróbios estritos e fastidiosos no seu crescimento. O género *Mycobacterium* engloba cerca de 170 espécies, sendo que *Mycobacterium tuberculosis* é considerada a mais patogénica, associada ao desenvolvimento de tuberculose, uma doença de notificação obrigatória quando detetada.

A pesquisa deste bacilo é efetuada mais frequentemente em amostras de secreção brônquica, e também em líquido pleural, biópsias e pontas de escova. No entanto, pode ser feita em urina ou outras amostras, quando há suspeita de tuberculose extrapulmonar.

Dadas as suas características microbiológicas, o *Mycobacterium tuberculosis* aparece em número reduzido nas lâminas coradas por Ziehl-Neelsen e nas culturas, o que justifica a importância de **descontaminar** a amostra da sua flora comensal e concentrá-la, isolando o mais possível o agente causador da tuberculose. Para o efeito, é utilizado o *kit Mycoprosafe®*, baseado na ação da N-acetil-L-cisteína e hidróxido de sódio (NaOH) em elevadas concentrações, e adiciona-se ainda um suplemento antibiótico. Este método permite aumentar a eficiência do **isolamento** de micobactérias, ao eliminar seletivamente outros microrganismos e liquefazer a amostra para uma melhor recuperação das micobactérias presentes - a N-acetil-L-cisteína permite dissolver a amostra e libertar os bacilos, enquanto o NaOH descontamina a amostra da restante flora.

Após **concentração** e centrifugação a 4000 rotações por minutos (rpm) durante 20 minutos, ao sedimento obtido é ajustado o pH com tampão fosfato para 6,8 – 7,4. Este é então distribuído: são inoculados 0,3 mL para o meio sólido de Lowenstein-Jensen, 0,1 mL para uma lâmina para coloração Ziehl-Neelsen do concentrado obtido e 0,5 mL para um frasco de hemocultura para micobactérias que será incubado no aparelho BacT/Alert, no módulo MB. A incubação do meio de Lowenstein-Jensen é bastante prolongada – só se conseguem resultados definitivos negativos após seis a oito semanas de incubação a 37°C. Neste meio, as colónias sugestivas de *Mycobacterium tuberculosis* apresentam um aspeto típico, semelhante ao topo de uma couve-flor. Se o BacT/Alert detetar crescimento de micobactérias, o frasco é retirado e executam-se duas lâminas para coloração de Gram e Ziehl-Neelsen para confirmar a presença das micobactérias.

A identificação e antibiograma são efetuados no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, para onde são enviadas as amostras positivas para micobactérias.

## Micologia

Em qualquer amostra se pode pesquisar a presença de fungos. Caso sejam uma espécie predominante na cultura e, presumivelmente, o agente causador de infeção, são isolados em meio Sabouraud a 37°C durante 48 horas. Se for observada a presença de colónias sugestivas deve proceder-se ao exame a fresco e posterior prova da filamentação. Esta indicia, caso se revele positiva, a presença de *Candida albicans*, não requerendo mais testes de identificação. Caso seja negativa, procede-se à identificação e antibiograma, através das cartas YST (identificação de fungos) e YS07 (teste de sensibilidade a antifúngicos).

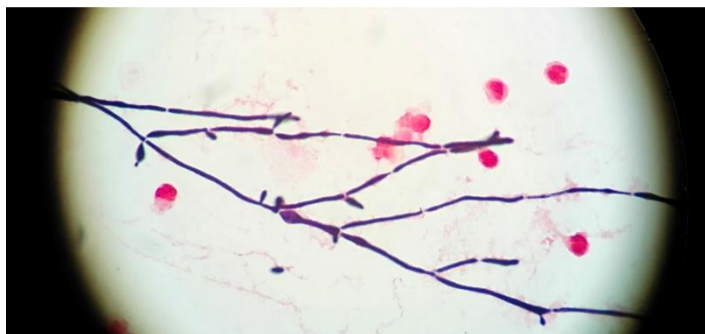


Figura 10. Fungos leveduriformes, com hifas bem desenvolvidas, numa amostra de urina após coloração de Gram.

Para a pesquisa de **fungos filamentosos**, cujo crescimento é mais exigente, efetua-se o designado *slide* de fungos, sobretudo para a pesquisa de *Aspergillus* spp. Este consiste em recortar um pequeno retângulo de agar Sabouraud, no qual se inocula a amostra com o auxílio de uma zaragatoa. O retângulo é então colocado entre lâmina e lamela a incubar em atmosfera húmida entre 24 e 72 horas e então observado ao microscópio ótico, onde se procuram hifas e estruturas que permitam diferenciar as diferentes espécies.

## Virologia

### *Deteção de vírus respiratórios em idade pediátrica*

Os **vírus respiratórios** são os únicos cuja deteção está a cargo do Sector de Microbiologia, a partir de amostras de aspirado nasofaríngeo, sendo mais predominante esta pesquisa em bebés ou crianças e nos meses de Outono e Primavera, pois é nestas estações e nesta faixa etária que as infeções víricas respiratórias atingem o seu pico. Esta determinação é particularmente importante no diagnóstico rápido, sensível e específico em idades pediátricas ou mesmo neonatais, evitando a administração desnecessária de antibióticos.

Esta pesquisa é efetuada pelo método da microscopia de fluorescência, utilizando um microscópio e lâminas específicas para o efeito. A técnica utilizada permite a deteção do RSV, *influenza* A e B, *parainfluenza* 1, 2 e 3, adenovírus através de anticorpos monoclonais e anticorpos secundários marcados com FITC e azul de Evans em contacto com uma suspensão de células de aspirado nasofaríngeo.

A observação de um padrão de fluorescência intracelular específico (citoplasmático para o RSV e *parainfluenza*, nuclear para os vírus *influenza* e para o adenovírus), sempre em comparação com o controlo negativo, determina um resultado positivo.

## Parasitologia

O exame morfológico direto das diferentes formas de vida do parasita nos produtos de excreção, secreção ou nos tecidos do hospedeiro, é um método direto empregue como

primeira linha de diagnóstico das parasitoses, ao qual se pode recorrer em qualquer amostra.

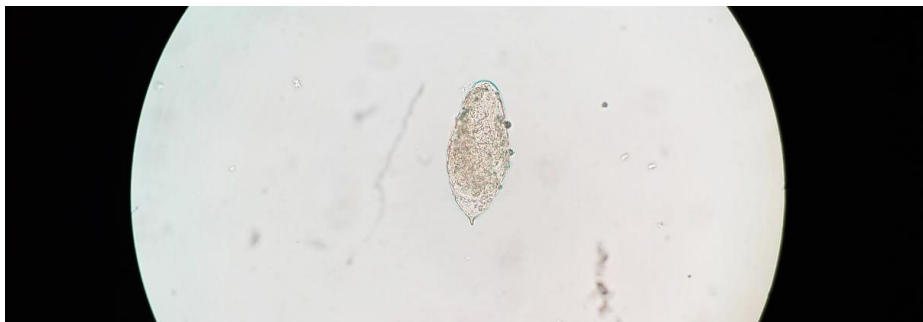


Figura 11. Ovo de *Shistosoma haematobium*, no exame a fresco de uma amostra de urina. Ampliação de 400x.

No laboratório, esta pesquisa faz-se, particularmente, em amostras de fezes – preferencialmente três, colhidas com um a dois dias de intervalo entre si – utiliza-se um *kit* que se baseia no **método de Ritchie modificado** para a sua concentração e pesquisa de ovos, quistos e larvas, as formas de vida parasitárias excretadas nas fezes.

Nas amostras de exsudado vaginal, pesquisa-se a presença de parasitas como *Trichomonas vaginalis*. O exame direto é feito a fresco, através de uma suspensão em soro fisiológico observada ao microscópio ótico.

#### Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos são efetuados a quase todas as espécies microbiológicas isoladas neste Sector, sendo essencialmente um processo automatizado por se efetuar no equipamento para este efeito. São de extrema importância, na medida em que permitem assegurar que os antimicrobianos utilizados na terapêutica são eficazes numa infecção em particular, sobretudo se já usados de forma ainda empírica, e detetar resistências emergentes no meio hospitalar e na comunidade. Esta é, portanto, uma tarefa diária e rotineira nos laboratórios de Microbiologia Clínica, e cuja complexidade e exigência de conhecimentos de Farmacologia, Microbiologia e Epidemiologia vem aumentando com o aparecimento e importância clínica das resistências aos antimicrobianos.

De um modo geral, a interpretação dos resultados deste teste envolve classificar o isolado quanto à sua suscetibilidade ao antibiótico e determinar o mecanismo de resistência mais provável.

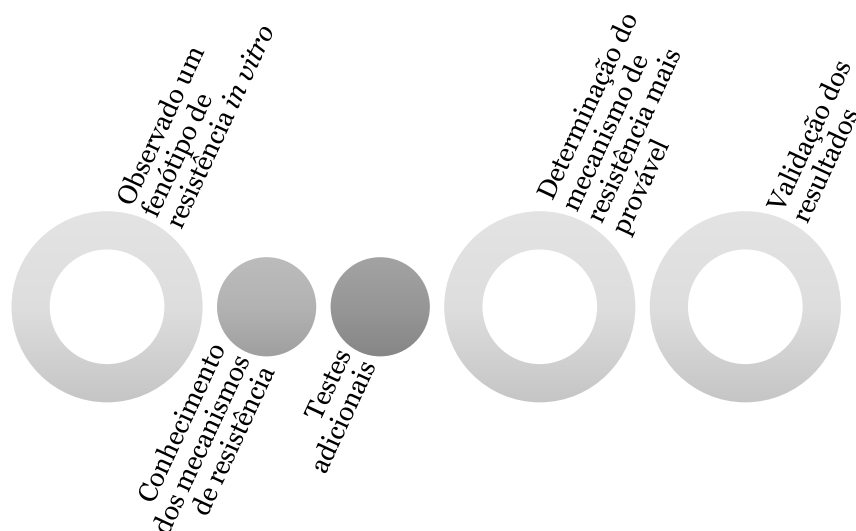


Figura 12. Sequência interpretativa dos testes de suscetibilidade aos antibióticos.

Quantitativamente, a medida da suscetibilidade de microrganismos baseia-se na determinação da concentração mínima inibitória (MIC) – a concentração de antibiótico mais baixa que permite inibir o crescimento de um isolado microbiológico, ou seja, é uma medida da sua atividade antimicrobiana, da capacidade de inibir o crescimento bacteriano. É com base nos valores da MIC, padronizados internacionalmente, que se comparam os diversos métodos de teste da suscetibilidade aos antibióticos adotados e se categorizam os isolados testados como resistentes, intermédios ou sensíveis, de acordo com as regras EUCAST.

#### Técnicas utilizadas nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos

O Sector de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica recorre para o efeito a métodos de natureza manual – o E-test ou a difusão de disco em placa de Müller-Hinton – e automatizada. Os métodos utilizados, independentemente do princípio em que se baseiam, estão padronizados de acordo com as *guidelines* de comités internacionais, como o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) e o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). As *guidelines* definidas pela EUCAST foram desenvolvidas com base nos achados clínicos, *breakpoints* clínicos e mecanismos de resistência conhecidos para apoiar os laboratórios de microbiologia clínica, discriminando as ações a tomar perante resultados concretos do antibiograma: recomendações para reportar ou inferir outras resistências e respetivos mecanismos com base numa resistência específica são alguns dos exemplos. Estão também incluídas, naturalmente, as resistências intrínsecas e excecionais.



## *Métodos manuais*

### *E-test*

O E-test permite testar quantitativamente, de forma simplificada, a resistência ou suscetibilidade a um antibiótico de uma estirpe, devolvendo os valores da MIC para uma vasta gama de antibióticos. Utiliza, para o efeito, tiras impregnadas com um gradiente de concentração de antibiótico bem definido e padronizado através de uma graduação no topo. É o principal método utilizado para confirmar resultados obtidos no equipamento automatizado (o método padrão nos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos) e obter mais informações sobre um isolado bacteriano.

### *Difusão de disco em placa*

A metodologia de Kirby e Bauer para antibiograma é a mais difundida e utilizada até hoje na rotina de análises clínicas, devido a sua simplicidade de execução, baixo custo e fiabilidade dos seus resultados. Apesar da sua relativa simplicidade de execução, esta técnica manual exige que as instruções sejam seguidas rigorosamente, de forma a que os resultados obtidos correspondam à realidade e possam ser comparados com as tabelas internacionais.

Este método envolve a utilização de discos impregnados com uma concentração conhecida de antibiótico num meio sólido no qual foi semeada uma suspensão de um isolado. A medição do halo de inibição permite interpretar o resultado, reportado sob a classificação de Resistente, Intermédio ou Sensível.

Este método é sobretudo utilizado para a identificação de anaeróbios Gram negativos e também em determinadas espécies em que os métodos automatizados não se encontram disponíveis no Laboratório (como, por exemplo, as estirpes de *Campylobacter* spp.).

## *Métodos automatizados*

O equipamento automático para este efeito, o *VITEK®2 Compact* da BioMérieux®, constitui o recurso de primeira linha para os testes de suscetibilidade aos antibióticos. Este equipamento efetua os antibiogramas de acordo com as regras CLSI e EUCAST mais atuais para a deteção de resistências aos antimicrobianos, e é segundo as mesmas que, no seguimento dos resultados obtidos, fornece orientações para a deteção de resistências específicas e clinicamente relevantes. O *VITEK®2 Compact* usa pequenas cartas em plástico com numerosos poços contendo soluções de 30 µL do antibiótico a testar numa suspensão do isolado de densidade padronizada. Este equipamento devolve os seus resultados com base no seu *software* de interpretação de resultados, que usa os valores de MIC sempre atualizados para determinar padrões de resistência já conhecidos, emergentes ou completamente novos.

# Hematologia Laboratorial e Hemostase

Fevereiro de 2016

## Introdução

O sector de Hematologia Laboratorial e Hemostase dá resposta aos pedidos analíticos dos Serviços Clínicos do CHPVVC, nomeadamente o Internamento, a Consulta Externa e Serviço de Urgências. Este Sector, como todo o Serviço, funciona 24 horas por dia, efetuando as análises que a seguir se descrevem sucintamente.

## Recursos e equipamentos presentes em Hematologia Laboratorial

Apesar dos avanços na tecnologia automatizada aplicada ao estudo laboratorial do sangue, o diagnóstico adequado das doenças hematológicas ainda está dependente de uma grande intervenção dos profissionais de Patologia Clínica, nomeadamente na identificação de alterações morfológicas em esfregaços de sangue periférico, tendo por base o contexto clínico do paciente. Para este e outros fins, o Sector de Hematologia Laboratorial e Hemostase do Serviço de Patologia Clínica dispõe dos equipamentos abaixo discriminados.

### Contadores hematológicos automáticos

O Sector de Hematologia dispõe dos equipamentos *ADVIA™ 2120* e *Sysmex™ XE 2100* para a execução de **hemogramas**, sendo o último usado como equipamento de *background* confirmatório.

Em qualquer dos casos, independentemente da tecnologia aplicada, ambos os equipamentos se baseiam nos seguintes fatores para efetuar a contagem total e diferencial leucocitária:

- Tamanho;
- Estrutura/complexidade interna;
- Lobularidade nuclear;
- Granularidade citoplasmática.

### *ADVIA® 2120*

O sistema ADVIA 2120, utiliza amostras de sangue total colhidas em anticoagulante EDTA-K<sub>3</sub> para realizar as contagens completas e diferenciais dos leucócitos e eritrócitos, em valor absoluto e percentagem de células e contagem de reticulócitos, através de dois tipos de reações:

1. **Citometria de fluxo**, em que a dispersão de luz emitida por um *laser* condutor permite efetuar a contagem total e diferencial, ao dimensionar e classificar cada subpopulação leucocitária. Isto torna-se possível pelo facto de a luz dispersa

variar de acordo com a dimensão e complexidade celular, logo cada população celular produz uma dispersão diferente, que é lida por recetores óticos e interpretada. Concretamente, no ADVIA®2120, a esterificação isovolumétrica dos eritrócitos, plaquetas e reticulócitos pelos tensioativos, e respetiva análise posterior através do citómetro ótico simples, permite a respetiva contagem.

2. **Reações citoquímicas**, que acontecem nas cinco câmaras de reação do equipamento:

- Câmara de reação da **Hb**, em que a Hb é doseada através da formação do complexo férrico monoaquomonohidroxiferri-porfirina e leitura espectrofotométrica a 546 nm;
- Câmara de reação de **basófilos**, em que a lise de todas as células à exceção destas são lisadas pelo reagente ADVIA 120 BASO, que contém ácido ftálico e um tensioativo responsável.
- Câmara de reação de **peroxidase**, para contagem diferencial de leucócitos, à exceção dos basófilos. Os leucócitos são fixados pelo reagente *ADVIA 2120 PEROX 1*, que contém formaldeído em meio hipertónico. As células são então coradas pelos reagentes *ADVIA 2120 PEROX 2* e *ADVIA 2120 PEROX 3*, que permite ao peróxido de hidrogénio formar um precipitado escuro em zonas com peroxidase endógena ativa nas granulações dos leucócitos. Os leucócitos são então diferenciados com base no seu tamanho e atividade da peroxidase - os neutrófilos, eosinófilos e monócitos são corados de acordo com os seus níveis de atividade.

*Sysmex® XE2100*

O sistema hematológico *Sysmex® XE2100* é um equipamento de diagnóstico totalmente automatizado que realiza a contagem e diferenciação precisa e totalmente automática dos seguintes elementos figurados do sangue periférico e a determinação do conteúdo em Hb, em sete câmaras de reação:

- Eritrócitos e plaquetas (câmara *RBC*).
- Contagem diferencial de leucócitos, exceto basófilos (câmara *DIFF*).
- Contagem total de leucócitos e basófilos (câmara *WBC/BASO*).
- Contagem de eritrócitos imaturos nucleados (câmara *NRBC*).
- Reticulócitos (câmara *RET*).
- Granulócitos imaturos (câmara *IMI*).
- Conteúdo em Hb (canal de fluxo).

Este equipamento é principalmente utilizado em amostras provenientes dos Serviços de Pediatria ou Neonatologia, para contagem de eritroblastos, amostras com pouco volume, ou ainda para confirmar resultados obtidos no sistema ADVIA® 2120.

Por outro lado, este equipamento de *background* funciona através de **impedância eletromagnética** (nas câmaras *RBC*, *IMI*), **citometria de fluxo** por *laser* semiconductor (nas câmaras *DIFF*, *WBC/BASO*, *NRBC*, *RET*) e **fluorescência** e usa o surfactante **SLS-Hb** para determinar o conteúdo em Hb em canal de fluxo.

Todas as células na amostra atravessam um feixe de *laser* semiconductor, criando assim um fluxo laminar, ao qual faz-se incidir sobre cada célula radiação em várias direções:

- *Forward Scattered Light*, que incide de frente na célula e é difundida através da mesma, permitindo avaliar o tamanho celular;
- *Side Scattered Light*, que incide lateralmente na célula e é sendo dispersa em todas as direções, permitindo avaliar a complexidade/granularidade celular;
- *Side Fluorescent Light*, que incide lateralmente na célula e indica a atividade de fluorescência celular das histonas, relacionando-se assim com a quantidade de DNA e RNA que a célula contém.

É utilizada ainda a impedância eletromagnética, na medida em que as células presentes na amostra passam em fluxo num espaço entre dois elétrodos com cargas opostas, alterando a resistência elétrica criada entre ambos os polos numa medida proporcional ao volume da célula e gerando uma alteração no potencial entre os elétrodos. A radiofrequência permite ainda determinar a estrutura molecular interna.

A informação obtida quanto a estes parâmetros (tamanho celular, complexidade celular e conteúdo em material genético), permite ao aparelho fazer a contagem total e diferencial dos leucócitos, contagem dos eritrócitos imaturos, reticulócitos e plaquetas.

#### Autoanalísadores das frações de Hb

- Adams™ *A1c HA 8160*, destinado ao **doseamento da hemoglobina glicosilada (HbA1c)** e às isoformas de hemoglobina (Hb) **A<sub>1</sub>**, **A<sub>2</sub>** e **F** através de cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC), permitindo a obtenção de resultados para HbA1c, HbA<sub>2</sub> e HbF estáveis e outras variantes, se presentes, como Hb S, E, D ou C.
- DCA 2000®, destinado ao doseamento da **HbA1c** segundo a metodologia de inibição da aglutinação imunológica do látex, em amostras pediátricas, provenientes da consulta de diabetes pediátrica.

## Outros equipamentos disponíveis

- *SediPlus® S2000*, destinado à determinação da **velocidade de sedimentação** (VS).  
O *SediPlus® S2000* é um equipamento que possui um processo de medição de transmissão por IV, e um sistema eletrônico para microprocessador.
- Dois equipamentos Roche™ *Cobas b123 POC System*, destinados às **gasimetrias** arteriais e determinação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no sangue.
- STAGO™ *Sta-R Evolution*, destinado aos estudos da **coagulação** por método cronométrico e cromogénico.
- ADVIA™ S60, que executa os **esfregaços de sangue periférico** com a coloração May-Grünwald Giemsa.
- Um microscópio ótico e um microscópio de fluorescência.

## A rotina laboratorial em Hematologia e Hemostase

A este serviço chegam amostras colhidas em diferentes tubos, por se destinarem a diferentes fins, pelo que necessitam de ser devidamente inseridos nos respetivos equipamentos a que se destinam. Incluem-se neste conjunto:

- Tubo com **EDTA-K<sub>3</sub>**, destinados à realização do hemograma, doseamento da HbA1c e a esfregaços de sangue periférico, quando necessário e/ou requerido.  
Os tubos destinados unicamente ao doseamento da HbA1c são armazenados no frigorífico para análise em dias pré-determinados (todas as quartas e sextas-feiras). O mesmo acontece aos tubos que servem simultaneamente ambos os propósitos, mas após a execução do hemograma e, se necessário, do esfregaço de sangue periférico.
- Tubo com **citrato de sódio**, quando destinados a estudos da coagulação (citrato de sódio 1:9) e velocidade de sedimentação (citrato de sódio 1:4). Os últimos devem ser cuidadosamente homogeneizados antes de inseridos no equipamento.
- **Seringa** de gasimetria arterial, que deve ser imediatamente analisada após a sua entrada no Serviço.
- Tubos com **outros líquidos biológicos**: o LCR é colhido para um tubo esterilizado sem anticoagulante; outros líquidos biológicos, como o líquido pleural, ascítico ou peritoneal, são colhidos em tubo com EDTA-K<sub>3</sub>.

Segue-se então a análise destas amostras nos equipamentos correspondentes. Ao longo de todo o dia, chegam amostras dos Serviços de Urgência, de Cirurgia e de Internamento.

As Técnicas Superiores de Saúde deste serviço validam todos os resultados apresentados pelos equipamentos, que se encontram ligados ao SISLAB, quando considerados normais e/ou concordantes com a história clínica do paciente. Todos os resultados considerados anormais ou discrepantes são posteriormente avaliados e, sempre que se justifique, procede-se à observação dos esfregaços sanguíneos e/ou confirmação dos resultados noutra equipamento. Concretamente, esta confirmação e/ou repetição, mais habitualmente do hemograma, é efetuada quando se observam os seguintes achados, como consta da Norma n.º 063/2011 de 30/12/2011 da Direcção-Geral de Saúde (DGS), como, por exemplo:

- Leucocitose ( $> 30 \times 10^9/L$ ) ou leucopenia ( $< 1,0 \times 10^9/L$ ) acentuadas.
- Inversões na fórmula leucocitária:  $> 10\%$  de eosinófilos,  $> 15\%$  de monócitos ou  $> 2\%$  de basófilos.
- Neutrofilia ( $> 20 \times 10^9/L$ )
- Presença de granulócitos imaturos, blastos ou linfócitos atípicos.
- Anemia grave, com  $Hb < 7.0 \text{ g/dL}$ .
- Trombocitopenia (plaquetas  $< 100 \times 10^9/L$ ) ou trombocitose (plaquetas  $> 1.0 \times 10^{10}/L$ ).
- Presença de plaquetas gigantes.
- Anisocitose com  $RDW > 14\%$ .
- Presença de  $> 2\%$  reticulócitos.
- Qualquer achado discrepante face à história clínica do paciente e/ou resultados laboratoriais anteriores.

## Análises efetuadas em Hematologia Laboratorial e Hemostase

### Hemograma completo

O hemograma consiste na contagem total e diferencial e no estudo da morfologia e constituição dos elementos sanguíneos. É a análise laboratorial mais frequentemente solicitada neste sector, sendo um dos principais meios complementares de diagnóstico na prática clínica.

Os analisadores automáticos utilizados fazem a contagem diferencial dos leucócitos, expressas em percentagem e em valores absolutos segundo as características morfológicas do núcleo e citoplasma, definindo a população celular a que pertence cada célula e o respetivo nível de maturação ou diferenciação celular. Os contadores hematológicos automáticos fornecem uma contagem considerada exata e precisa de células, distribuídas pelas respetivas populações e atendendo ao seu grau de diferenciação celular. Esta

contagem automatizada exata e precisa permite uma observação microscópica de um menor número de amostras que requerem uma análise mais profunda.

No entanto, a correta utilização e interpretação dos mesmos exige o domínio do conhecimento que é necessário para avaliar histogramas e gráficos de dispersão e interpretar corretamente as mensagens do equipamento. Estas mensagens que o aparelho pode exibir são os designados *flags*, indicativos da presença de blastos, linfócitos atípicos ou granulócitos imaturos e/ou de alterações de morfologia eritrocitária.

Devem-se sempre comparar os resultados atuais com o historial clínico e laboratorial do paciente, e, se necessário, proceder à repetição do hemograma (noutro equipamento ou recorrendo a uma nova amostra), ou observação do esfregaço do sangue periférico.

Assim, através da tecnologia automática supracitada, efetuam-se as seguintes análises no âmbito da execução do hemograma completo:

#### *I. Contagem total e diferencial de leucócitos e células precursoras*

#### *II. Avaliação da série eritrocitária*

- Contagem total de eritrócitos (RBC);
- Doseamento da Hb;
- Hematócrito (Htc)
- Coeficiente de variação de eritrócitos (RDW)
- Determinação de índices hematimétricos:
  - Volume globular médio (MCV);
  - Hemoglobina globular média (MCH);
  - Concentração de hemoglobina globular média (MCHC);

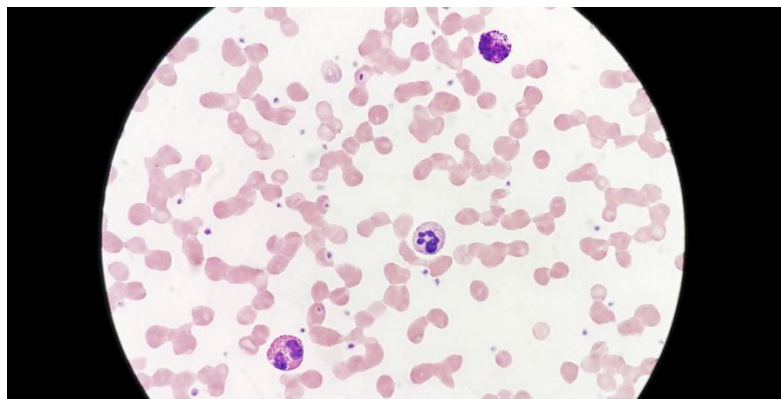
#### *III. Contagem total de plaquetas*

#### *IV. Contagem de reticulócitos (se solicitado)*

Estudo manual da morfologia eritrocitária, leucocitária e plaquetária

A observação do esfregaço de sangue periférico constitui uma etapa fundamental na investigação de alterações e patologias hematológicas e na monitorização das mesmas, podendo, inclusivamente, ser determinante num diagnóstico.

O esfregaço de sangue periférico é produzido de forma semi-automatizada, no equipamento ADVIA™ *AutoSlide Stainer Maker* e ADVIA™ S60, pela técnica de May-Grünwald Giemsa modificada, e observados ao microscópio ótico.



*Figura 13. Exemplo de um campo microscópico de um esfregaço de sangue periférico. Da esquerda para a direita, observa-se um eosinófilo, um neutrófilo e um basófilo.*

Em qualquer caso, a observação microscópica dos esfregaços do sangue periférico deve, então, ter em conta:

- I. Avaliação da qualidade do esfregaço*
- II. Avaliação de cada uma das três linhagens celulares*
  - Eritrocitária
    - Número de células
    - Tamanho (normocíticos, microcíticos ou macrocíticos)
    - Conteúdo em hemoglobina (normocrômicos, hipocrômicos ou hipercrômicos)
    - Presença de empilhamento, aglutinação e *rolleaux*
    - Presença de formas atípicas – células em lágrima, acantócitos, equinócitos, células em alvo, esferócitos, poiquilócitos, estomatócitos.
    - Presença de inclusões: pontuado basófilo, corpos de Howell-Jolly.
    - Formas imaturas: eritrócitos policromatófilos e eritroblastos
  - Leucocitária
    - Contagem total e diferencial de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.
    - Pesquisa de formas imaturas: blastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos.
    - Variações na morfologia celular: linfócitos reativos, granulações tóxicas, desgranulação, vacuolização, neutrófilos com núcleo hipersegmentado
  - Plaquetária
    - Número
    - Tamanho



- Presença de agregados plaquetários e plaquetas gigantes

### III. *Presença de parasitas e outros microrganismos.*

O elemento parasitário mais frequentemente pesquisado no sangue é o *Plasmodium* spp., o que envolve também a pesquisa dos respetivos antígenos através de imunocromatografia.

### Doseamento de frações de hemoglobina

O doseamento das diferentes formas de hemoglobina é executado com recurso ao equipamento Adams™ *A1c HA 8160*. Esta análise permite o diagnóstico de patologias associadas a alterações na estrutura da hemoglobina, nomeadamente talassemias, anemia falciforme (ou drepanocitose), ou auxiliar no diagnóstico e *follow-up* da diabetes *mellitus* através do doseamento da Hb1Ac.

#### *HbA1c*

A hemoglobina apresenta-se no adulto normal sob três formas: Hb A ( $\pm$  96%), Hb A2 (2,5 - 3%) e Hb F (< 1%). A fração Hb A pode subdividir-se nas hemoglobinas A1a, A1b, e A1c, designadas em conjunto por hemoglobina glicosilada, das quais a Hb A1c é a mais abundante. A glicosilação da hemoglobina é um processo irreversível, daí que os níveis sanguíneos das hemoglobinas glicadas estejam condicionadas quer pela vida média dos eritrócitos (aproximadamente 120 dias), quer pelo valor de glicemia. Assim se depreende que o doseamento da fração A1c fornece indicação do conteúdo médio de glicose no sangue nos últimos 30 a 60 dias.

Os valores normais de referência para a HbA1c variam entre 4% e 6%, sendo valores superiores associados a um acréscimo do risco de complicações da diabetes *mellitus*. A sua determinação deve ser realizada rotineiramente a todos os pacientes diabéticos no início do tratamento, de forma a documentar o grau de controlo glicémico, e trimestralmente como controlo metabólico do paciente.

#### *Hemoglobina A<sub>2</sub> e F*

As frações de Hb A2, e fetal (Hb F) são doseadas ao mesmo tempo que é doseada a HbA1c, no sentido de rastrear ou diagnosticar doentes com  $\alpha$  ou  $\beta$  talassemias. As talassemias caracterizam-se pela produção de formas tetraméricas de Hb instável, cursando com anemia microcítica hipocrómica, anisocitose, reticulocitose e hemólise periférica, por eritropoiese ineficaz e extramedular, variando com o grau de severidade com que se manifeste. Este quadro verifica-se laboratorialmente através da redução nos valores de MCV, MCH, concentração de Hb e o doseamento das referidas isoformas de Hb.

O equipamento fornece as percentagens de cada isoforma de Hb em amostras de sangue com anticoagulante EDTA, sendo que através destes valores se pode inferir uma suspeita de

talassemia, requerendo a posterior avaliação do hemograma e do esfregaço de sangue periférico. De um modo geral, ocorre progressivamente diminuição da percentagem de Hb A<sub>1</sub> (ou mesmo a sua ausência), uma ligeira subida da percentagem de Hb A<sub>2</sub> para 2 – 3,5%, prevalecendo quase na totalidade a Hb F (80-100%) nas formas mais severas das talassemias.

#### Velocidade de sedimentação



*Figura 14. Tubos destinados à determinação da VS inseridos no respetivo equipamento.*

A VS é determinada em amostras de sangue colhidas num tubo de diâmetro e altura definidos, com anticoagulante citrato de sódio (1:4), no equipamento *SediPlus® S2000*.

A VS está dependente de diversos fatores, entre eles a quantidade e morfologia dos eritrócitos e a concentração plasmáticas de proteínas de fase aguda, intervenientes nos processos inflamatórios. Assim, a VS estará alterada em algumas patologias – é o caso de processos de infeção, inflamação ou neoplasia - mas também em estados fisiológicos - como a gravidez, idade avançada, entre outros - pelo que este será um teste, ainda que simples e rápido, de especificidade insuficiente, utilizado como auxiliar no diagnóstico e na monitorização de algumas terapêuticas.

#### Gasimetria arterial

A gasimetria arterial é um exame considerado invasivo, que requer análise urgente, com a finalidade de medir a concentração e saturação de oxigénio (O<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), a ventilação e também o estado ácido/base do doente através do pH do sangue. Este exame é normalmente pedido quando o quadro clínico do paciente sugere uma eventual patologia associada à oxigenação e/ou respetiva terapêutica, ventilação ou estado ácido/base e função renal do paciente.

O sangue é colhido por um médico, habitualmente da artéria radial (no punho), com uma seringa heparinizada. Para esta prática não deve ser utilizado sangue venoso, exceto em crianças. As determinações são realizadas nos equipamentos Cobas b123 POC, um

analisador que permite a medição de pH, gases sanguíneos, eletrólitos, hematócrito, lactato e saturação de O<sub>2</sub>.

A tabela abaixo apresenta sucintamente os achados indicadores de cada um destes quadros numa gasimetria arterial.

*Tabela 5. Indicadores de acidose ou alcalose metabólica ou respiratória numa gasimetria arterial.*

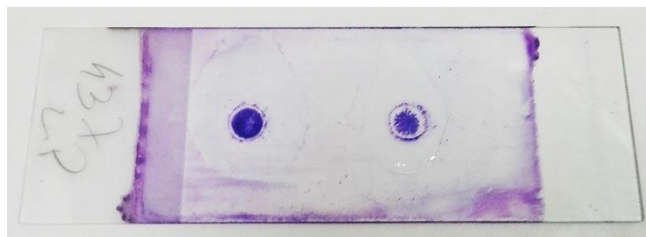
Acidose	Respiratória	pH baixo PCO <sub>2</sub> elevada HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> elevado	<i>Típica de um quadro de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC)</i>
	Metabólica	pH baixo PCO <sub>2</sub> diminuída HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> baixo	
Alcalose	Respiratória	pH elevado PCO <sub>2</sub> diminuída HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> elevado	<i>Hiperventilação pode ser uma das causas, por pânico ou ansiedade, por exemplo.</i>
	Metabólica	pH elevado PCO <sub>2</sub> normal HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> elevado	<i>Pode ser um quadro secundário a vômitos ou queimaduras graves</i>

Uma gasimetria arterial permite, deste modo, auxiliar o clínico no estabelecimento de um diagnóstico e terapêutica. Conclui-se, portanto, que se trata de uma análise muito útil em casos de:

- Insuficiência respiratória, cardíaca, renal, hepática ou multiorgânica
- Estados hiperglicémicos graves, associados a diabetes *mellitus*.
- Queimaduras de segundo e/ou terceiro grau.
- Intoxicação, envenenamento.
- Sépsis
- Pacientes com prognóstico reservado.

### Contagem de células noutros líquidos biológicos

Nas amostras de líquido ascítico, pleural, sinovial, é feita a contagem do total de células nucleadas, no ADVIA® 2120, apenas se procedendo à contagem diferencial após *cyto-spin* - que permite a concentração celular, preservando a morfologia das células - caso a contagem de células nucleadas total exceda as 250/μL. Nestes casos, a linhagem celular predominante permite estabelecer a etiologia e a conduta terapêutica a adotar pelo clínico.

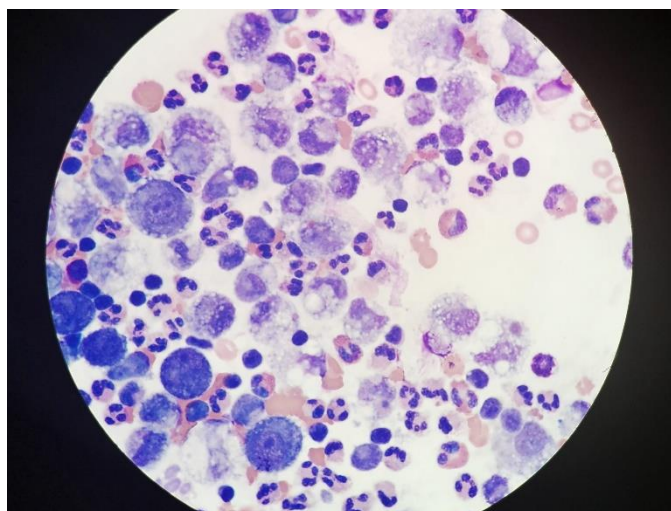


*Figura 15. Lâmina de cyto-spin de líquido pleural, para contagem diferencial ao microscópio ótico.*

No caso específico do LCR é feita a contagem diferencial no mesmo equipamento.

No líquido pleural e ascítico, a contagem diferencial permite:

1. Distinguir se o predomínio celular é de linfócitos ou neutrófilos.
2. Distinguir se se trata de um exsudado ou transudado, tendo cada um um conjunto de causas etiológicas distintas.
3. Suspeitar da presença células malignas, geralmente em *clusters*.



*Figura 16. Observação de uma lâmina de cyto-spin ao microscópio ótico, para contagem diferencial de leucócitos. Ampliação de 1000x.*

### Estudo da hemostase e coagulação

A hemostase representa o equilíbrio entre as proteínas pró e anticoagulantes no sangue, que previne a hemorragia quando existe lesão do endotélio vascular. O seu desequilíbrio pode, portanto, originar fenómenos hemorrágicos ou trombóticos que o estudo dos parâmetros hemostáticos pode minimizar, além de auxiliar no ajuste e monitorização da terapia com anticoagulantes orais. Assim se conclui a importância de uma investigação cuidada dos doentes na área da hemostase, através de análises para monitorização, avaliação e diagnóstico de riscos e eventos trombóticos e hemorrágicos - nomeadamente para estudo pré e pós-operatório e pós-traumático, em conjunto com o exame físico e história clínica e familiar. Assim se avalia, nomeadamente, a integridade da via intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação, a função plaquetária e a presença de imunoglobulinas que interfiram na coagulação.

Estas análises são realizadas em amostras de plasma em tubo de citrato de sódio na razão 1:9, no equipamento STAGO™ *Star-R Evolution*. É de salientar que estas amostras são antes centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, à temperatura ambiente. A análise deve sempre ser realizada nas 4h após a colheita sendo que a proporção anticoagulante/amostra deve ser respeitada.

Para a realização do estudo laboratorial da hemostase, o equipamento utiliza métodos de cronometria (medição do tempo de coagulação), colorimetria ou imunológicos, incluindo na análise os parâmetros elencados na tabela seguinte:

*Tabela 6. Parâmetros avaliados no estudo da hemostase no equipamento STAGO Sta-R Evolution e respetivos métodos de determinação.*

Ensaio	Metodologia
Estudo do sistema de coagulação	
Tempo de Tromboplastina Parcial cativada (aPTT)	Método cronométrico
Tempo de Protrombina (TP)	Método cronométrico
<i>International Normalized Ratio</i> (INR)	
Doseamento do fibrinogénio	Método cronométrico
Doseamento de inibidores	
<i>Antitrombina III</i>	Método cromogénico
<i>Proteína C</i>	Método cronométrico
<i>Proteína S</i>	Método cronométrico
<i>Atividade do fator Anti-Xa</i>	Método cromogénico
Estudo do sistema fibrinolítico	
<i>D-dímeros</i>	Imunoturbidimetria
Outras provas	
<i>Pesquisa de Anticoagulante Lúpico (aCL)</i>	Método cronométrico

#### *Tempo de protrombina (PT) e Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)*

O PT permite detetar a maior parte das síndromes hemorrágicas causadas por defeitos na cascata da coagulação – seja na via intrínseca, extrínseca ou comum, sejam congénitos ou adquiridos – e trata-se ainda da análise *standard* na monitorização da terapêutica anticoagulante oral.

O aPTT avalia a via intrínseca da cascata de coagulação e a via comum, o que indica alteração nos fatores II, V, VIII, IX, X, XII ou de fibrinogénio, essencial à monitorização da terapia com heparina não-fracionada em pacientes de risco para episódios hemorrágicos e/ou trombóticos. Permite detetar anomalias nestas vias, sejam congénitas ou adquiridas, e a presença de inibidores da via comum e intrínseca da cascata da coagulação.

A terapêutica com anticoagulantes orais deve ser monitorizada e ajustada sempre que se justifique pela determinação do PT e da INR. A INR permite a uniformização dos resultados do PT, tem em consideração a sensibilidade do reagente (a tromboplastina) e o ensaio utilizado, padronizando os resultados entre laboratórios e entre pacientes.

#### *D-Dímeros*

Constituem produtos de degradação da fibrina, indicando, caso estejam em níveis anormais em circulação, a formação e decomposição significativas de coágulos, podendo estes serem a causa da patologia e sintomatologia do paciente. O doseamento de D-dímeros é particularmente útil no diagnóstico ou exclusão de quadros de trombose venosa profunda, embolia pulmonar, coagulação intravascular disseminada, doença hepática, e ainda a monitorização pós-cirúrgica ou pós-traumática.

#### *Fibrinogénio*

O doseamento do fibrinogénio – o fator de coagulação mais abundante no plasma - permite avaliar inúmeras anomalias congénitas que influenciam a conversão de fibrinogénio em fibrina. Por ser, além de uma proteína essencial à cascata da coagulação, uma proteína de fase aguda de síntese hepática, permite identificar a presença de inflamação, infeções e neoplasias, doença hepática, risco trombótico, coagulação intravascular disseminada, síndromes fibrinolíticas e outros distúrbios na sua síntese e degradação.

#### *Inibidores da coagulação*

##### *Antitrombina III (AT III)*

Inibidor da trombina e de outros fatores, determinado por método cromogénico. A sua deficiência provoca fenómenos trombóticos.

##### *Proteína S*

A proteína S é um cofator da proteína C dependente da vitamina K. através da qual estimula a proteólise dos fatores V e VIII e a promoção da fibrinólise pela libertação do ativador do plasminogénio (TPA) da célula endotelial. A proteína S encontra-se no plasma sob a forma de uma proteína livre ativa da coagulação fisiológica.

##### *Proteína C*

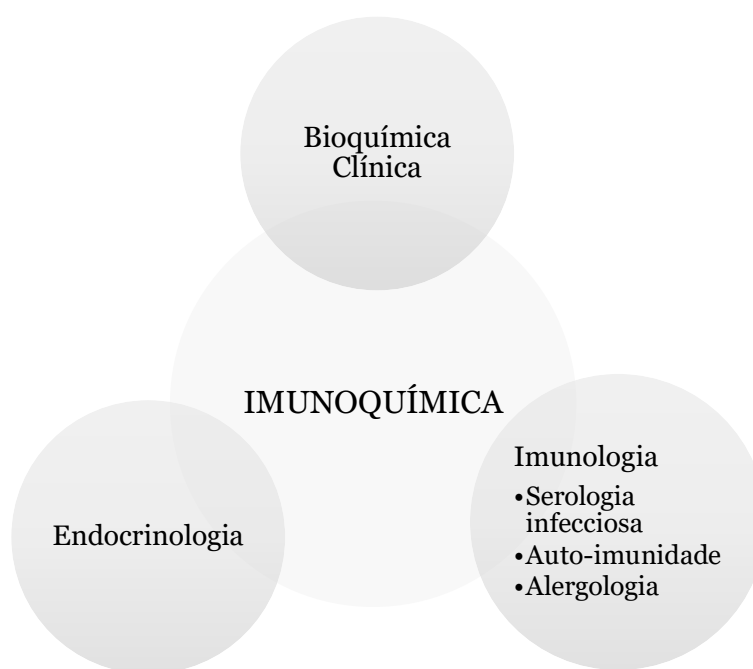
A proteína C é um inibidor da coagulação, dependente de vitamina K e também do seu cofator, a proteína S. Esta proteína é responsável por regular os fatores V e VIII.

# Imunoquímica

Março de 2016

Há uma multiplicidade de estruturas e processos bioquímicos com influência nos processos biopatológicos, cuja determinação é fundamental ao diagnóstico e monitorização da terapêutica e evolução clínica. A importância da Bioquímica Clínica e da Imunologia na prática médica reside, portanto, no facto de estas assegurarem informação oportuna, relevante, exata e específica sobre o quadro clínico do paciente, em constante interdisciplinaridade no acompanhamento de uma série de patologias.

São ainda efetuadas neste Sector determinações no âmbito da Imunologia infecciosa, Autoimunidade, Alergologia e Endocrinologia, como representado na figura abaixo.



*Figura 17. Organização do sector de imunoquímica.*

A interpretação não deverá, portanto, basear-se apenas na análise de apenas um único parâmetro isolado, mas sim de um conjunto de parâmetros, com base numa história e suspeita clínica.

## Introdução ao Sector

O Sector de Imunoquímica encontra-se fisicamente dividido em dois espaços. À entrada, as amostras são entregues num suporte para tubos, e são centrifugadas para obtenção do soro ou plasma. Associados ao número da requisição analítica, estão os códigos de barras das etiquetas dos tubos necessários às determinações associadas a cada amostra, pelo que, através do computador, se podem imprimir as etiquetas e separar as alíquotas, posteriormente distribuídas pelos diversos aparelhos. Simultaneamente, faz-se a verificação macroscópica de quaisquer sinais de hemólise, icterícia ou a correta execução da

colheita. Por exemplo, as amostras destinadas à determinação de vitamina B<sub>12</sub> e folatos devem ser protegidas da luz, com papel de alumínio.

É sempre também criado um tubo de reserva de soro para armazenar na seroteca, a -50°C, durante cerca de um mês no laboratório e mais um mês fora do Serviço, noutra seroteca.

Noutra sala, são efetuadas todas as determinações, pois é onde se encontram todos os equipamentos e recursos deste Sector.

## Análises efetuadas a soro ou plasma

### Sistemas automatizados

#### *A interface: o software Process System Management (PSM)*

Todos os equipamentos Roche™ estão ligados a um *software* que estabelece a interface entre os mesmos e o sistema informático do Laboratório, o SISLAB, estabelecendo entre eles uma ligação bidirecional.

O *Process System Management* (PSM) funciona como interface entre os aparelhos Roche™ e o *host software* SISLAB. Opera como um condutor em todos os processos laboratoriais, desde a receção das amostras, monitorização do controlo de qualidade interno até à validação, distribuição das amostras e arquivo das mesmas. Deteta também potenciais interferências nas amostras, como a presença de hemólise ou icterícia, bloqueando os respetivos valores ou resultados, obrigando a uma reavaliação pelo Técnico Superior ou Patologista Clínico responsável, e aceitação ou não dos valores obtidos.

Se estes fatores de interferência forem detetados, os Técnicos de Análises Clínicas pedem uma nova amostra, estando a revalidação dos resultados à responsabilidade do Técnico Superior ou Patologista Clínico.

#### *Imunoquímica*

##### *Roche™ Cobas® 6000*

O *Cobas® 6000* é um analisador de imunoquímica, totalmente automatizado e computadorizado. Destina-se à determinação qualitativa ou quantitativa *in vitro* de uma larga gama de parâmetros bioquímicos e imunológicos em vários fluidos orgânicos, maioritariamente no soro.

É constituído por uma estação de dados e 3 módulos ligados, um módulo para eletrólitos (sódio, potássio e cloro, determinados por potenciometria indireta), o módulo c501® para determinações em Bioquímica Clínica e o módulo e601® para determinações em Endocrinologia, Imunologia da Infecção, marcadores tumorais, cardíacos, ósseos, de fertilidade e de anemia, combinando-os assim num único sistema integrado.

O *Cobas® 6000* baseia-se em 3 metodologias diferentes:



- **Fotometria** no módulo c501®.
- **Potenciometria indireta** no módulo ISE®.
- **Electroquimioluminescência** (ECLIA) no módulo e601®.

O seu *software* permite a gestão de dados (número de identificação do doente e identificação dos testes) e das calibrações, controlos de qualidade e consulta, validação e arquivo de resultados.

#### Módulo ISE®

O módulo ISE® permite a determinação de eletrólitos por potenciometria indireta, nomeadamente potássio e sódio.

#### Módulo c501®

Este módulo destina-se sobretudo a determinações na área da Bioquímica Clínica, e baseia-se na **fotometria** e **imunoturbidimetria** – isto é, utiliza as propriedades da dispersão da luz dos complexos antígeno-anticorpo – para quantificação de proteínas do soro, ao utilizar anticorpos específicos para as mesmas. Utiliza também o método colorimétrico, pela técnica de espectrofotometria e métodos enzimáticos.

Tabela 7. Parâmetros determinados no Roche™ Cobas® 6000, módulo c501®.

CÓDIGO	NOME DO TESTE	METODOLOGIA
PROTEÍNAS ESPECÍFICAS		
CRPLX	Proteína C Reativa	Imunoturbidimetria
C3C-2	Proteína C3c do sistema de complemento	
C4-2	Proteína C4 do sistema de complemento	
IGA	Imunoglobulina A	
IGG	Imunoglobulina G	
IGM	Imunoglobulina M	
KAPP2	Cadeias leves κ	
LAMB2	Cadeias leves λ	
ENZIMAS E SUBSTRACTOS		
CÓDIGO	Nome do Teste	Metodologia
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina	Determinação cinética enzimática
ADA	Adenosina Desaminase	Ensaio colorimétrico de acordo com recomendações da Federação Internacional de Química Clínica (IFCC)
ALP2L	Fosfatase Alcalina	
ALTL	Alanina Aminotransferase	
ASTL	Aspartato Aminotransferase	
AMYL2	α-amilase	Ensaio colorimétrico enzimático padronizado de acordo com a IFCC
CKL	Creatina Cinase	Determinação cinética UV em conformidade com IFCC e Sociedade Germânica de Química Clínica (DGKC)
GGT-2	γ-glutamilttransferase	Ensaio colorimétrico enzimático de acordo com recomendações IFCC e SZASZ.
LDHL	Lactato Desidrogenase	Determinação cinética enzimática padronizada pela DGKC
ALB2	Albumina	Ensaio colorimétrico
BIL-D	Bilirrubina direta	Ensaio colorimétrico: método Diazo
BILT2	Bilirrubina total	
CHOL	Colesterol total	Método colorimétrico enzimático

CREJ	Creatinina	Ensaio colorimétrico enzimático baseado no método Jaffé, de acordo com IFCC e <i>isotope-dilution mass spectrometry</i> (IDMS)
GLUC3	Glucose	Determinação cinética enzimática, pela hexocinase
HDLC3	Colesterol HDL	Método colorimétrico enzimático
LDL_C	Colesterol LDL	Método colorimétrico enzimático
MG	Magnésio	Ensaio colorimétrico
PHOS	Fosfato inorgânico	Ensaio colorimétrico UV com fosfomolibdato
TP2	Proteínas totais	Ensaio colorimétrico pela reação do biureto
TRIGL	Triglicéridos	Método colorimétrico enzimático
UA2	Ácido úrico	Método colorimétrico enzimático
UREAL	Ureia	Determinação cinética enzimática com urease e glutamato desidrogenase

#### Módulo e601®

O módulo e601® é, tal como o restante equipamento, totalmente automatizado. Baseia-se essencialmente em **ensaios imunológicos** para a determinação qualitativa e quantitativa *in vitro* de diversos parâmetros, seguidamente discriminados, em amostras de soro, LCR e outros líquidos biológicos.

Entre os referidos parâmetros figuram importantes determinações para o diagnóstico em meio hospitalar, nomeadamente marcadores cardíacos e tumorais e hormonas, entre outros parâmetros.

A técnica de ECLIA usada neste módulo baseia-se em espécies químicas altamente reativas, que são geradas a partir de precursores estáveis à superfície de um eletrodo de platina, reagindo entre si para produzir luz, sendo a reação quimioluminescente eletricamente despoletada ao aplicar tensão aos complexos imunológicos formados.

Este equipamento possui ligação bidirecional ao sistema informático do laboratório, efetuando transmissão de dados de e para o analisador, avaliação de resultados de doentes e gestão do controlo de qualidade, executados automaticamente pelo *software* PSM.

Tabela 8. Parâmetros determinados no Roche™ Cobas® 6000, módulo e601®

ENDOCRINOLOGIA E MARCADORES TUMORAIS		
CÓDIGO	Nome do Teste	Metodologia
FUNÇÃO DA TIRÓIDE		
A-TG	Anticorpos anti-tiroglobulina	ECLIA
A-TPO	Anti-tiroperoxidase	
T3	Triiodotironina (T3)	ECLIA
FT3 III	Triiodotironina livre	
T4	Tiroxina (T4)	
FT4 II	Tiroxina livre	
TSH	Hormona estimulante da tiroide	
TG II	Anticorpos anti-tiroglobulina	
MARCADORES TUMORAIS		
AFP	α-fetoproteína	ECLIA
CA 15.3 II	CA 15.3	
CA 19.9	CA 19.9	
CA 125 II	CA 125	
CEA	Antigénio carcinoembrionário	
PSA TOTAL	Antigénio específico da próstata total	
FPSA LIVRE	Antigénio específico da próstata livre	
IGE TOTAL II	Imunoglobulina E total	ECLIA
HEPATITE		
A-HAV	Anticorpos anti-vírus da hepatite A total	ECLIA
A-HAV IGM	Anticorpos anti-vírus da hepatite A (IgM)	
HBE AG	Antigénio HBe	
ANTI-HBE	Anticorpos anti-antigénio HBe	
ANTI-HCV IGM	Anticorpos anti-vírus da hepatite C (IgM)	
MARCADORES DE ANEMIA		
VIT B12 II	Vitamina B12	ECLIA
FOL III	Ácido fólico	

*Roche™ Cobas® Integra 400 plus*

É um sistema que permite consolidar vários testes de bioquímica clínica – desde enzimas e substratos, iões, drogas terapêuticas e proteínas específicas – com rapidez e facilidade.

Integra quatro métodos diferentes:

- Fotometria de absorvância para enzimas e substratos;
- Imunoturbidimetria para proteínas específicas;
- Fluorescência polarizada para drogas terapêuticas;
- Potenciometria indireta para iões.

Os testes efetuados no *Cobas® Integra 400 plus* encontram-se listados na tabela da página seguinte.

Tabela 9. Parâmetros determinados no Cobas® Integra 400 plus.

CÓDIGO	NOME DO TESTE	METODOLOGIA
ENZIMAS E SUBSTRACTOS		
ALP2L	Fosfatase alcalina	Ensaio colorimétrico de acordo com recomendações da Federação Internacional de Química Clínica (IFCC)
ALTL	Alanina aminotransferase	Determinação cinética enzimática sem piridoxal-5'-fosfato, em conformidade com a IFCC
ASTL	Aspartato aminotransferase	
AMYL2	$\alpha$ -amilase	Ensaio colorimétrico enzimático padronizado de acordo com a IFCC
CKL	Creatina Cinase	Determinação cinética UV em conformidade com IFCC e Sociedade Germânica de Química Clínica (DGKC)
GGT-2	$\gamma$ -glutamilttransferase	Ensaio colorimétrico de acordo com recomendações IFCC e SZASZ
LIPC	Lipase	Ensaio colorimétrico enzimático
LDHL	Lactato Desidrogenase	Determinação cinética enzimática padronizada pela DGKC
ALBT2	Microalbumina	Imunoturbidimetria
ALB2	Albumina	Ensaio colorimétrico
BIL-D	Bilirrubina direta	Ensaio colorimétrico: método Diazo
BILT2	Bilirrubina total	
CREJ	Creatinina	Ensaio colorimétrico enzimático baseado no método Jaffé, de acordo com IFCC e <i>isotope-dilution mass spectrometry</i> (IDMS)
GLUC3	Glucose	Método enzimático, pela hexocinase
IRON	Ferro	Método FerroZine
MG	Magnésio	Ensaio colorimétrico
NH3L	Amónia	Método enzimático, pela glutamato desidrogenase
PHOS2	Fosfato inorgânico	Ensaio colorimétrico UV com fosfomolibdato
TP2	Proteínas totais	Ensaio colorimétrico pela reação do biureto
UA2	Ácido úrico	Método colorimétrico enzimático
UREAL	Ureia	Determinação cinética enzimática com urease e glutamato desidrogenase

## PROTEÍNAS ESPECÍFICAS

AAT2	$\alpha$ 1-antitripsina	
ASO	Anticorpos antistreptolisina O	Imunoturbidimetria
CRPLX	Proteína C Reativa	
FERR2	Ferritina	Imunoturbidimetria
HAPT2	Haptoglobina	
RF-II	Fator reumatoide	
TRSFS	Transferrina	

## MONITORIZAÇÃO TERAPÊUTICA DE FÁRMACOS

CARB	Carbamazepina	
PHNY	Fenitoína	Fluorescência polarizada
VALP	Valproato de sódio	
VANC	Vancomicina	

### *Imunologia Infeciosa e Endocrinologia*

#### **VIDAS®**

O **VIDAS®** é um equipamento semiautomatizado multiparamétrico de imunoanálise. Este equipamento utiliza cones de utilização única, que servem ambos os propósitos de pipetagem das amostras e de fase sólida da reação, dado que se encontram sensibilizados com antigénios ou anticorpos específicos consoante o teste a efetuar. Os restantes reagentes encontram-se pré-distribuídos em barretes, para onde se dispensam as amostras antes de as inserir no aparelho. Após esta etapa, o aparelho executa todos os testes automaticamente. As determinações que este equipamento efetua baseiam-se na técnica *Enzyme-linked Fluorescent Assay* (ELFA), um imunoensaio enzimático que utiliza fosfatase alcalina como enzima com o respetivo substrato, o 4-metil-umbeliferol fosfato, com deteção final por fluorescência da produção de um fluorocromo por hidrólise enzimática deste composto, a 4-metil-umbeliferona, que reemite luz a 450 nm após excitação a 370 nm. A concentração final de produto de reagente libertado é então determinada através de um leitor ótico fluorimétrico.

Os testes de avidéz das imunoglobulinas G requerem barretes duplas, sendo uma delas o teste de referência, e a outra contém ureia, que vai quebrar a ligação antigénio-anticorpo. A comparação entre os resultados obtidos resultará numa avidéz forte, fraca ou intermédia. Os parâmetros determinados no **VIDAS®** encontram-se elencados na tabela seguinte.

Tabela 10. Parâmetros determinados no VIDAS®.

CÓDIGO	NOME DO TESTE
IMUNOLOGIA INFECCIOSA	
EBV VCA IGM	
EBV VCA/EA IGG	Vírus Epstein-Barr
EBV EBNA IGG	
TOXO IGM	Anticorpos IgM e IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i>
TOXO IGG II	
TOXO IGG AVID	
RUB IGM	Anticorpos anti-rubéola
RUB IGG II	
CMV IGM	
CMV IGG	Anticorpos anti-citomegalovírus (CMV)
CMV IGG AVID	
OUTRAS DETERMINAÇÕES	
B2M	B2-microglobulina
PCT	Procalcitonina

Roche™ Cobas® e 411

Este equipamento totalmente automatizado funciona com base na técnica de ECLIA, num princípio igual ao do módulo *e601*® do equipamento Cobas® 6000.

Dado que executa parâmetros, como os marcadores cardíacos, que são de carácter urgente, este equipamento está permanentemente ligado.

Tabela 11. Parâmetros determinados no Cobas® e411.

CÓDIGO	NOME DO TESTE	METODOLOGIA
MARCADORES TUMORAIS		
HCG+B	Gonadotrofina coriônica humana (βhCG)	ECLIA
CA 72.4	CA 72.4	
MARCADORES CARDÍACOS		
DIGOXIN	Digoxina	ECLIA
MYO STAT	Mioglobina	
PROBNP II	Precursor N-terminal do péptido natriurético cerebral	
TNT HSST	Troponina T de alta sensibilidade	



## SEROLOGIA INFECCIOSA

HIV COMBI PT	Anticorpos totais anti-HIV 1 e 2 e antígeno p24	
HBS AG II	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B	
A-HBS	Anticorpos anti-antígeno de superfície do vírus da hepatite B	
A-HBC	Anticorpo anti-antígeno core do vírus da hepatite B	
A-HCV ))	Anticorpos anti-hepatite C totais	ECLIA
RUB IGG	Anticorpos anti-rubéola (Ig G)	
RUB IGM	Anticorpos anti-rubéola (Ig M)	
TOXO IGG	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (Ig G)	
TOXO IGM	Anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (Ig M)	
CMV IGG	Anticorpos anti-CMV (Ig G)	
CMV IGM	Anticorpos anti-CMV (Ig M)	

## ENDOCRINOLOGIA

PTH	Hormona paratiroide	
C PEPTID	Péptido C	
INSULIN	Insulina	
CORTISOL	Cortisol	
DHEA-S	Sulfato de de-hidroepiandrosterona	
E2-III	Estradiol	ECLIA
FSH	Hormona folículo-estimulante	
LH	Hormona luteinizante	
PROG II	Progesterona	
TESTO II	Testosterona	
PRL II	Prolactina	
VITD-T	Vitamina D	

### *Autoimunidade e Alergologia: Phadia™ UNICAP®*

No Sector de Imunoquímica são ainda executadas análises na área da Alergologia e Autoimunidade através do equipamento *Phadia™ UNICAP® 100*, desenvolvido para os testes segundo a tecnologia *ImmunoCAP®*. Esta consiste em imunoensaios fluoroenzimáticos (FEIA) *in vitro* para determinação quantitativa de imunoglobulinas específicas no soro. Este sistema foi, portanto, desenvolvido especificamente para o diagnóstico de alergias e doenças autoimunes.

### Doença alérgica

As doenças alérgicas surgem geralmente na infância, mas podem ocorrer em qualquer idade, devido a fatores hereditários, ambientais e inerentes ao estado de saúde do indivíduo. A exposição ou contacto com o alergénio despoleta a respetiva sensibilização, na medida em que ocorre uma produção exacerbada de imunoglobulinas E após exposição ao mesmo. Em consequência, são libertadas, por desgranulação dos mastócitos, substâncias pro-inflamatórias como a histamina. Esta e outras substâncias são a causa principal dos sintomas alérgicos mais comuns.

No CHPVVC, faz-se a avaliação da doença alérgica nos pacientes que apresentam sintomas alérgicos – do trato gastrointestinal, eczema, rinite ou asma – numa cooperação entre a consulta de Alergologia e o Laboratório, de acordo com a figura seguinte.

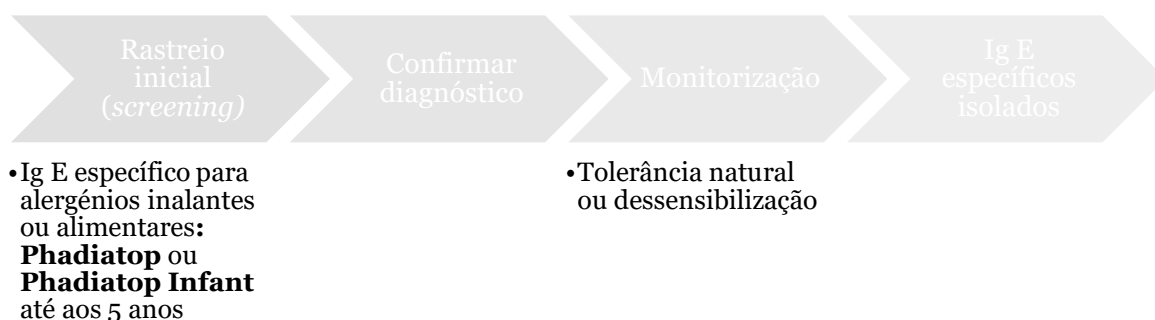


Figura 18. Esquema de diagnóstico de alergias no CHPVVC.

A alergologia molecular mede a sensibilização aos componentes individuais dos alergénios, o que permite obter um perfil de Imunoglobulinas E do doente. Neste sentido, utiliza-se o reagente específico *ImmunoCAP®*, que consiste no componente alergénico recombinante ligado covalentemente a uma fase sólida de um polímero de celulose porosa e elástica.

O alergénio, componente alergénico ou mistura de alergénios de interesse, ligado covalentemente à fase sólida, reage com as imunoglobulinas E específicas para o mesmo, presentes no soro do paciente. Depois da lavagem das imunoglobulinas E não específicas, anticorpos secundários anti-Ig E marcados por enzimas ligam-se aos complexos antígeno-anticorpo previamente formados. Após nova lavagem, é então adicionada a solução de desenvolvimento, que permite incubar o substrato desta enzima e o consequente aparecimento de fluorescência. A sua intensidade é medida após a adição da solução de *stop*, sendo proporcional à quantidade de imunoglobulinas E específicas presentes na amostra e comparáveis a uma curva de calibração.

Os ensaios imunológicos para o diagnóstico de alergias e asma englobam mais frequentemente alergénios dos seguintes grupos:

- Pólenes de gramíneas, ervas e árvores

- Microrganismos
- Ácaros e pó da casa
- Animais com pelo: cão, gato, cavalo, entre outros.
- Insetos
- Alergénios alimentares

Numa fase inicial, são utilizados os testes de *screening Phadiatop®* e *Phadiatop® Infant*, estando o último destinado a crianças com menos de cinco anos de idade. Nesta faixa etária, a sensibilização alérgica é mais frequentemente causada por alerígenos alimentares, mas também podem surgir alergias a fatores inalantes (pó da casa, ou ácaros).

Um resultado positivo nos *screenings* através dos testes *Phadiatop* e *Phadiatop Infant* requer o desdobramento deste painel de *screening* nos alerígenos (inalantes ou inalantes e alimentares, respetivamente) consensualmente mais comuns para a respetiva faixa etária, de forma a, de acordo com as recomendações do Alergologista do CHPVVC, determinar qual o alerígeno ao qual o paciente se encontra sensibilizado

O esquema que se segue permite elucidar este desdobramento efetuado no CHPVVC nos alerígenos a pesquisar.

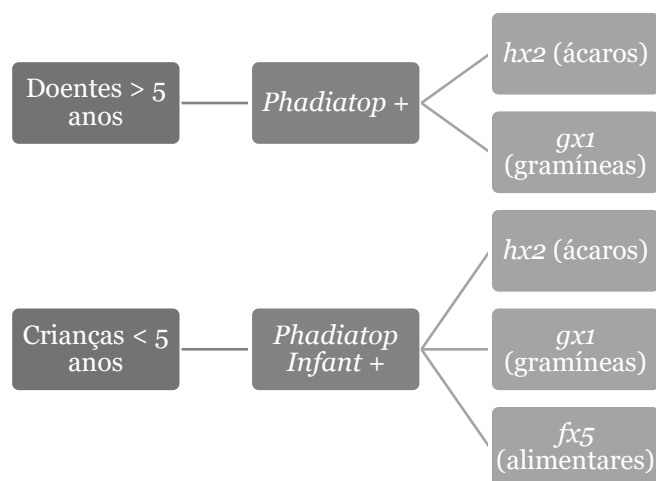


Figura 19. Algoritmo de testes no diagnóstico da doença alérgica.

### Doença autoimune

As doenças autoimunes caracterizam-se por o sistema imunitário detetar falsamente as células do próprio organismo como invasoras, “atacando-as” produzindo autoanticorpos. A autoimunidade pode afetar o indivíduo portador de uma patologia autoimune de forma localizada, restrita a um tecido ou órgão-alvo, ou de forma sistémica, afetando várias partes do corpo.

Os autoanticorpos podem ser a causa de uma doença autoimune, mas por norma são apenas um marcador da doença, não o motivo. Podem ser detetados no soro, por exemplo através

das análises ao sangue EliA, e servem de marcadores de diagnóstico para doenças autoimunes específicas.

As doenças autoimunes podem dividir-se em dois grupos: doenças específicas de órgãos e doenças sistêmicas.

As doenças específicas de órgãos incluem doenças como a tiroidite de Hashimoto ou a doença celíaca, em que órgãos específicos (no caso da doença celíaca trata-se do revestimento do intestino delgado) são atacados pelo sistema imunitário.

As doenças sistêmicas podem afetar qualquer parte do organismo e diversos sistemas ao mesmo tempo, incluindo vários órgãos. As doenças como o lúpus eritematoso disseminado (LED) e a artrite reumatoide pertencem ao grupo das doenças sistêmicas.

O teste EliA é um imunoensaio fluoroenzimático (FEIA) concebido como imunoensaio em *sandwich*. Um poço é revestido com um antigénio que é reconhecido pelos anticorpos alvo, representando os marcadores para determinada doença autoimune. Se estes anticorpos específicos estiverem presentes na amostra de sangue do doente, ligar-se-ão ao antigénio. No passo seguinte da reação, um anticorpo secundário conjugado com enzima liga-se ao anticorpo alvo, ligado ao antigénio.

A enzima transforma um substrato adicionado num produto fluorescente. A comparação do sinal de fluorescência com o de calibradores de concentrações conhecidas permite determinar a concentração de anticorpos na amostra do ensaio.

Neste sentido, no equipamento *Phadia*<sup>™</sup> 100, executam-se também as determinações listadas na tabela da página seguinte.

Tabela 12. Autoanticorpos detetados no Phadia™ 100 UNICAP®.

Autoanticorpos		Patologias possivelmente associadas
Screening de anticorpos antinucleares (ANA)		Lúpus Eritematoso Sistémico (SLE), Doenças Mistas do Tecido Conjuntivo (DMTC), Síndrome de Sjögren, Escleroderma, Polimiosite
Se positivos, são desdobrados em...		
Proteínas reguladoras da transcrição	Anti- <b>Ro</b> (ou SS-A) Anti- <b>La</b> (ou SS-B)	Síndrome de Sjögren, SLE
Ribonucleoproteínas	Anti- <b>Sm</b> Anti- <b>U1RNP</b>	SLE DMTC, SLE
Topoisomerase	Anti- <b>Scl70</b>	Escleroderma
Anti- <b>centrómero B</b>		
Histidil-tRNA sintetase	Anti- <b>Jo1</b>	Polimiosite, <i>Overlapping syndrome</i>
Anti-DNA de cadeia dupla ( <b>dsDNA</b> )		SLE
Outros autoanticorpos		
Perfil de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA)	Proteinase III (citoplasmática)	Granulomatose de Wegener, Poliangite Microscópica, Síndrome de Churg-Strauss, Glomerulonefrite Necrosante
	Mieloperoxidase (perinuclear)	
	Membrana basal glomerular	
Anti-péptido citrulinado (CCP)		Artrite reumatoide
Anti- <b>gliadina</b> (Ig A e Ig G)		Doença celíaca
Anti- <b>transglutaminase</b> intestinal (Ig A e Ig G)		
Anti- <b>cardiolipina</b> (Ig G e Ig M)		Síndrome antifosfolipídico
Anti- <b>β<sub>2</sub> glicoproteína I</b> (Ig G e Ig M)		

*Eletroforese das proteínas do soro e urina: Sebia™ HYDRASYS®*

É um equipamento semiautomático, no qual se executam eletroforeses em gel de agarose e imunofixação das proteínas da urina e do soro, também em gel de agarose, sendo a leitura do padrão electroforético lida no *software Phoresis®* e produzido o gráfico correspondente. A eletroforese de proteínas no soro é, deste modo, uma técnica simples para separar as proteínas do soro. Em condições normais, são separadas cinco bandas do soro: **albumina**, **α<sub>1</sub>**, **α<sub>2</sub>**, **β** e **γ globulinas**.

No caso de surgir um pico monoclonal, este deve ser investigado. Para tal, executa-se uma imunoeletroforese em gel de agarose, na qual se pesquisa qual o tipo de cadeia pesada e cadeia leve de imunoglobulinas associada à possível gamapatia monoclonal encontrada. Se esta confirmar a existência de uma gamapatia monoclonal, o doente é encaminhado para a consulta de especialidade.

Assim, com vista a permitir a sua quantificação, o equipamento *Hydrasys*® permite a execução das seguintes técnicas:

- Eletroforeses das **proteínas do soro e da urina** em gel de agarose, com corante negro de amido.
- **Imunoeletroforeses**, isto é, a deteção de **proteínas monoclonais** (as cadeias pesadas das imunoglobulinas G, A e M e ainda as cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$ ) por imunofixação, com corante violeta ácido.
- Pesquisa das proteínas de **Bence-Jones** na urina (cadeias leves monoclonais por imunofixação) com corante violeta ácido.

O equipamento executa automaticamente a aplicação das amostras no gel, a migração das proteínas, a lavagem e a coloração e secagem. Os passos manuais incluem a manipulação das amostras e do gel, e a configuração do equipamento para a eletroforese pretendida.

As proteínas são então separadas de acordo com a sua carga, ponto isoelétrico e massa molecular. O gel é retirado do equipamento após a eletroforese propriamente dita, e pode ser analisado com o auxílio de um *scanner* ligado a um computador com o *software Phoresis*®, que assim quantifica cada fração de proteínas e produz um gráfico correspondente.

Na **imunofixação**, as proteínas são separadas por eletroforese e depois imunoprecipitadas com anti-soros de especificidades diferentes: anti-cadeias pesadas  $\gamma$  (imunoglobulina G),  $\alpha$  (imunoglobulina A) e  $\mu$  (imunoglobulina M), e anti-cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$  livres e ligadas. Após imunofixação, as proteínas imunoprecipitadas são coradas com violeta ácido. Caso se confirme a presença de um componente monoclonal, é observada uma banda bem definida associada a uma classe de cadeia pesada e uma banda com o mesmo padrão de migração em relação às cadeias leves.

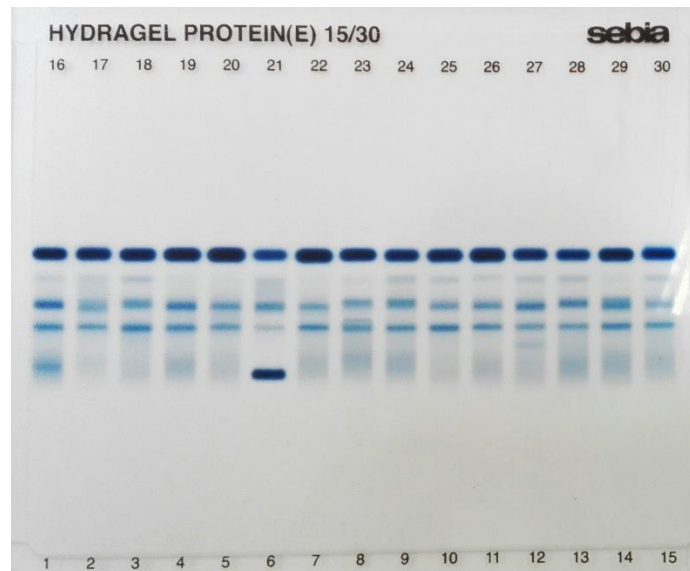


Figura 20. Exemplo de um gel de eletroforese das proteínas do soro, para um total de 15 amostras. A pista 6 representa uma amostra com um pico acentuado na fração de  $\gamma$ -globulinas.

A **eletroforese de proteínas da urina**, assim como do soro, está recomendada para o reconhecimento de paraproteínas nas gamopatias benignas ou malignas, especialmente no mieloma múltiplo e macroglobulinemia de Waldenström. Na presença de proteína de Bence-Jones (cadeias leves de imunoglobulinas), métodos específicos de identificação, como a análise de cadeias  $\kappa$  e  $\lambda$ , podem ser realizados para um diagnóstico mais específico.

#### *Análise sumária automatizada da urina*

A urina é considerada um dos barômetros do quadro clínico geral do paciente, sobretudo por permitir o diagnóstico de infecções do trato urinário, doenças renais, hepáticas e hemolíticas, diabetes e ainda outras doenças graves que ainda não apresentem sintomas e que podem ser tratáveis nas suas fases precoces.

Entre os parâmetros essenciais nesta análise sumária, figuram:

- Densidade específica
- pH
- Leucócitos
- Nitritos
- Proteínas
- Glucose
- Cetonas ou corpos cetônicos
- Urobilinogénio
- Bilirrubina
- Eritrócitos

Após a sua determinação, deve proceder-se à centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos, decantar o sobrenadante até cerca de 1/10 do seu volume, e observar o sedimento ao microscópio ótico, onde é realizada a pesquisa de eritrócitos, leucócitos, bactérias, leveduras, células epiteliais de descamação e do epitélio genitourinário, cilindros e cristais. A presença destes compostos em grande número pode estar associada a diferentes patologias.

### Roche™ URISYS® 2400

Este é um aparelho de análise de urinas que funciona segundo três métodos: fotometria de reflectância, refratometria e turbidimetria. É utilizado para análise de urina em larga escala, no qual as amostras são inseridas em simultâneo, e a respetiva identificação é feita com recurso a um leitor de código de barras incorporado no aparelho e com ligação aos computadores do Laboratório. Além dos parâmetros acima referidos, avalia também a tonalidade e turvação da urina.

### Roche™ Cobas® u411

Caso as amostras apresentem um volume insuficiente para serem analisadas no *Urisys® 2400* ou seja necessária uma análise confirmatória, utiliza-se o equipamento semiautomático *Cobas® u 411*.

As tiras de teste usadas no *Cobas® u 411*, as *Combur® test strips*, reagem mudando as suas cores, de acordo com os parâmetros analíticos que a análise sumária da urina engloba, anteriormente referidos, na configuração representada na seguinte figura:

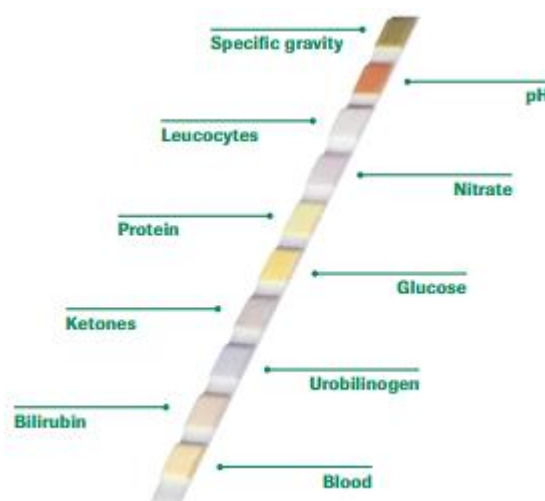


Figura 21. Tira de teste para urina Combur® test strip e parâmetros determinados nas mesmas.

No *Cobas® u 411*, estas tiras são analisadas pela técnica de fotometria de reflectância.

Outras determinações na urina que se podem efetuar, se requeridas, são:

- Razão albumina/creatinina (pode substituir a colheita de urina de 24 horas em alguns doentes)
- Razão proteínas totais/creatinina
- Ureia e ácido úrico
- Ionograma (sódio, potássio e cloro)
- Cálcio
- Fósforo



- Glicose

#### *Urina de 24 horas*

A urina de 24 horas segue os mesmos procedimentos da urina tipo II ou ocasional, com a diferença de que é avaliada a diurese total.

A urina de 24 horas é então utilizada para a determinação de:

- *Clearance* da creatinina: é uma medida da taxa de filtração glomerular, sendo o principal modo de avaliar a função renal, nomeadamente no rastreio da insuficiência renal crónica.
- Proteinúria e albuminúria.
- Ionograma urinário
- Ureia e ácido úrico
- Amilase
- Cálcio
- Fósforo
- Glicose

#### *Análise de outros líquidos biológicos*

A análise efetuada a outros líquidos biológicos que não o sangue ou a urina no Sector de Imunoquímica (isto é, LCR, líquido ascítico, pleural ou sinovial) engloba os seguintes parâmetros:

- É avaliado o pH, no equipamento *Cobas® b123®*.
- No equipamento *Cobas® 6000* (módulo *c501®*), é avaliado:
  - Glicose
  - Proteínas totais
  - LDH
  - Amilase
  - Adenosina desaminase (ADA)
  - Creatinina
- No caso do líquido sinovial, pesquisa-se também a presença de cristais e/ou leucócitos no microscópio ótico.
- A densidade é avaliada por refratometria, utilizando um refratómetro.

## Técnicas manuais de diagnóstico

### Técnicas manuais de diagnóstico no soro

#### *Diagnóstico de sífilis*

Os testes *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL) e *Treponema pallidum haemagglutination* (TPHA) permitem o *screening*, deteção da reinfeção e monitorização da evolução da infeção por *Treponema pallidum*, o agente patogénico causador da **sífilis**, uma doença tipicamente de transmissão por via sexual com manifestações clínicas que podem ser muito variáveis. Destas, as mais comuns são o aparecimento de lesões ou úlceras, cujo contacto direto é a forma mais usual de transmissão. Esta bactéria não é cultivável em laboratório, o que torna o diagnóstico serológico a alternativa mais viável, no soro ou no LCR, dado o neurotropismo que *Treponema pallidum* pode assumir, bem como formas congénitas por transmissão materno-fetal.

#### *Rapid plasma reagin (RPR)*

Este é um teste semelhante ao VDRL, na medida em que é um teste não-treponémico semiquantitativo de floculação macroscópica, utilizado para detetar anticorpos (reaginas) que surgem no decorrer da infeção por *Treponema pallidum*. A reação de RPR observa-se positiva uma a quatro semanas após o aparecimento das primeiras lesões. O teste RPR constitui uma modificação à reação de VDRL.

É um teste muito sensível, mas não muito específico, pois os anticorpos pesquisados podem surgir noutras patologias como lúpus ou a doença de Lyme. Normalmente, estes desaparecem num período que varia se houve ou não tratamento e se este teve sucesso, pelo que é um teste também usado para o orientar.

#### *Treponema pallidum haemagglutination (TPHA)*

O TPHA é um teste treponémico semiquantitativo rápido em que se faz a pesquisa de anticorpos específicos contra *Treponema pallidum* no soro do utente, através de uma reação de hemaglutinação indireta com eritrócitos sensibilizados com componentes antigénicos da bactéria.

Estes anticorpos manifestam-se durante toda a vida, numa concentração no soro que não tem relação direta com a severidade da infeção – logo, trata-se apenas de um teste confirmatório no diagnóstico da sífilis.

#### *Reação de Widal*

O serodiagnóstico de Widal contribui para o diagnóstico da febre tifoide. A reação de Widal consiste num teste rápido de aglutinação em placa ou tubo para deteção qualitativa e semi-

quantitativa de anticorpos contra o antígeno O e H de *Salmonella paratyphi* A, B e C, e *Salmonella typhi*.

Neste teste, utiliza-se uma suspensão contendo os respetivos antígenos, que irão aglutinar pela exposição a anticorpos a eles dirigidos. Os anticorpos dirigidos aos antígenos de *Salmonella paratyphi* A, B e C, e *Salmonella typhi* surgem no soro após a manifestação dos sintomas febris, entre a primeira e terceira semana.

#### *Reação de Weil-Felix*

Este teste consiste num ensaio de aglutinação com suspensões de antígenos de *Proteus* spp. (OX19, OXK e OX2) corados para pesquisa no soro de anticorpos livres específicos para antígenos de bactérias do género *Rickettsia* spp.. O teste pode ser efetuado em placa, sendo este o caso se se tratar de uma pesquisa, ou em tubo, tratando-se neste caso de uma titulação, efetuada quando a pesquisa é positiva.

Os anticorpos específicos para *Rickettsia* spp. presentes no soro irão reagir de modo cruzado com os antígenos utilizados de *Proteus* spp.. A maioria das **rickettsioses** causa doença sistémica com exantema, febre e cefaleias violentas.

#### *Reação de Wright*

A reação de Wright é um teste qualitativo em que se procura observar a aglutinação de anticorpos no soro com um reagente contendo antígenos de *Brucella abortus*. Quando esta pesquisa se revela positiva, é necessário determinar os títulos de anticorpos do tipo Ig G e Ig M anti-*Brucella*.

As bactérias deste género, em humanos, geram uma infeção designada por **brucelose**, e infetam células do sistema reticuloendotelial, aparecendo depois em órgãos como baço, fígado, medula óssea, nódulos linfáticos e rins, podendo ser, portanto, bastante debilitante ou mesmo adquirir carácter crónico. A transmissão desta infeção dá-se por exposição ocupacional com animais infetados, ingestão de produtos animais contaminados ou por inalação.

#### *Reação de Paul Bunnell*

A reação de Paul Bunnell visa classificar as aglutininas (ou anticorpos) heterófilas, do tipo Ig M, que surgem em mais de 80% dos casos de **mononucleose infecciosa**, causada pelo vírus Epstein-Barr. Este teste permite, através de um ensaio imunocromatográfico, detetar anticorpos heterófilos que reagem com antígenos extraídos de eritrócitos de bovino que revestem partículas à superfície do teste. A amostra migra pela superfície e interage com os antígenos do teste. Se a amostra contiver os anticorpos heterófilos de mononucleose infecciosa, surge então uma linha negra.

Os anticorpos heterófilos surgem em níveis máximos seis a oito semanas após a primoinfeção, sendo detetáveis até um ano depois.

#### *HIV Combo*

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) infecta células T, acabando por comprometer todo o sistema imunitário do indivíduo. O vírus pode ser detetado nos fluídos orgânicos, apresenta um período de incubação longo e assintomático e é transmitido por contacto direto com esses fluídos (por contacto sexual, com sangue e na transmissão vertical durante a gravidez, parto ou aleitamento).

O teste utilizado no laboratório para este fim, o *HIV Combo*, consiste num teste imunocromatográfico qualitativo para a deteção do antígeno p24 e de partículas víricas de HIV-1 e HIV-2, os vírus atualmente existentes. O antígeno p24 consiste numa proteína da cápside viral

Deste modo, a combinação da deteção do antígeno e dos anticorpos aumenta a probabilidade de diagnóstico precoce da infeção pelo HIV.

#### *Pesquisa serológica de autoimunidade hepática*

O diagnóstico de patologias autoimunes hepáticas, como a hepatite autoimune ou a cirrose biliar primária, é auxiliado pela pesquisa de autoanticorpos do tipo Ig G associados às mesmas, através de um imunoensaio colorimétrico enzimático, que permite diferenciá-los e detetar qualitativamente a sua presença no soro diluído.

Os autoanticorpos circulantes específicos do fígado estão presentes na maioria dos pacientes com estas patologias, ainda que o seu papel na patogénese e no grau de severidade destas doenças seja desconhecido. Estes incluem:

- Anti-mitocôndria (**AMA M2, M2-3E**)
- Anti-grânulos nucleares **Sp100** e **PML**
- Anti-**gp210**, do complexo do poro da membrana nuclear
- Anti-citocromo P450 do fígado e rim (**LKM-1**), anti-antígeno citosólico do fígado (**LC-1**)
- Anti-**SLA/LP**, porção de uma proteína associada ao tRNA.
- Anti-**Ro52**, uma proteína intracelular.

Os autoanticorpos referidos estão associados às patologias referidas na tabela seguinte.

Tabela 13. Autoanticorpos pesquisados no screening de hepatite autoimune e patologias associadas.

Autoanticorpos	Patologia associada
M2, SP100, PML, gp210	Cirrose biliar primária
LKM-1, SLA/LP, LC-1	Hepatite autoimune

Este teste utiliza tiras de teste constituídas por uma membrana revestida pelos respectivos antígenos hepáticos, purificados e bioquimicamente caracterizados, dispostos nas tiras de teste em linhas paralelas. No caso de uma amostra se revelar positiva, os anticorpos Ig G, Ig M e Ig A específicos vão ligar-se ao local correspondente ao seu antígeno. Para a sua detecção, utiliza-se um anticorpo Ig G secundário, específico contra as Ig G humanas, acoplado a fosfatase alcalina, adicionando-se de seguida o respetivo substrato cromogénico para a revelação de cor, na banda correspondente ao anticorpo detetado.

#### *Pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA)*

O diagnóstico de patologias autoimunes caracterizadas pelo aparecimento de autoanticorpos contra proteínas nucleares, sobretudo patologias autoimunes de atingimento sistémico, é auxiliado a nível laboratorial por um imunoensaio colorimétrico enzimático, que permite diferenciá-los e detetar qualitativamente a sua presença no soro diluído.

Os autoanticorpos nucleares pesquisados neste teste reagem com 14 antígenos:

- Núcleo de células produtoras de anticorpos (*anti-nuclear antibody-secreting cells*, **nRNP**)
- Ribonucleoproteínas **Sm**, **SS-A** e **SS-B**
- Topoisomerase (**Scl-70**)
- Exossoma RNA (**PM-Scl**)
- Histidil tRNA sintetase (**Jo-1**)
- Centrómero (**CENP B**)
- Antígeno nuclear de células em proliferação (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA)
- DNA de cadeia dupla (**dsDNA**)
- Nucleossoma
- Histonas
- Proteína P ribossomal
- Mitocôndria (**AMA-M2**)

### *Pesquisa de anticorpos contra fator intrínseco (IF) e antígeno das células parietais (PCA)*

A pesquisa de autoanticorpos específicos para o IF e o PCA está fortemente associada ao diagnóstico da gastrite atrófica crônica, sendo efetuada no laboratório com recurso a um imunoensaio enzimático colorimétrico semelhante ao usado no diagnóstico de hepatite autoimune ou na pesquisa de ANA.

Os anticorpos anti-IF e anti-PCA, se presentes, ligam-se aos antígenos correspondentes presentes na membrana, em bandas distintas. Utiliza-se depois um anticorpo secundário acoplado a fosfatase alcalina, adicionando-se de seguida o respetivo substrato cromogénico para a revelação de cor, neste caso em pequenos pontos roxos, na banda correspondente ao anticorpo detetado.

### *Técnicas manuais de diagnóstico em urina tipo II*

#### *Pesquisa de açúcares redutores*

A pesquisa de açúcares redutores na urina baseia-se na reação de Benedict, que utiliza uma reação de redução do sulfato de cobre para produzir cor. Esta cor que irá variar de acordo com a concentração de substâncias redutoras na urina. Esta concentração é expressa em percentagem, e permite efetuar o *screening* de **erros congénitos no metabolismo de hidratos de carbono**, embora seja pouco específico aos açúcares, mas sim apenas a substâncias redutoras no geral.

#### *Teste imunológico de gravidez*

A hCG é produzida pela placenta, podendo ser detetada nas grávidas a partir do 7º ao 10º dia após a conceção, atingindo um pico entre as 10 e as 12 semanas de gravidez.

O teste imunológico de **gravidez** na urina consiste, portanto, na deteção qualitativa da hCG através de um ensaio imunocromatográfico que usa uma combinação de anticorpos, incluindo um anticorpo monoclonal contra esta hormona. A amostra migra por capilaridade sobre uma membrana onde vai reagir com o conjugado colorido de anticorpo monoclonal específico para a hCG para formar uma linha colorida na membrana de teste.

#### *Pesquisa de drogas de abuso*

A pesquisa de drogas de abuso na urina é efetuada, numa primeira fase, através de um ensaio imunocromatográfico qualitativo. Estes testes envolvem apenas testar uma amostra de urina para determinadas drogas e/ou os seus metabolitos, proporcionando apenas um resultado preliminar. Há, nesse caso, a necessidade de realizar testes quantitativos, para confirmação dos resultados se necessário para fins médico-legais.

As drogas pesquisadas incluem as seguintes:

- Anfetaminas
- Barbitúricos
- Benzodiazepinas
- Cocaína
- Tetrahydrocannabinóides
- Metadona
- Metanfetaminas
- Opiáceos
- Antidepressivos tricíclicos
- Metilenodioximetanfetamina (*ecstasy*, MDMA), a pedido
- Paracetamol, a pedido, sobretudo em crianças.

## Técnicas manuais de diagnóstico em fezes

### *Determinação do pH*

O pH das fezes, normalmente situado entre 6,0 e 8,0, é dependente da dieta alimentar, da fermentação de açúcares no intestino e do seu teor de gordura. A fermentação que ocorre fisiologicamente e a produção de ácidos gordos são assim responsáveis pelo teor ligeiramente alcalino das fezes normais.

Este teste é útil no diagnóstico das diarreias por deficiência de dissacaridases, situação que leva a que os açúcares não absorvidos (lactose, sacarose), sob ação bacteriana, se transformem em ácido láctico, reduzindo o pH fecal. O pH aumenta, deste modo, com a decomposição de proteínas e diminui quando se verifica algum grau de intolerância a certos hidratos de carbono, nomeadamente dissacáridos, e gorduras.

Na intolerância aos dissacarídeos, o pH das fezes será menor que 5,3 e a pesquisa de substâncias redutoras será positiva. Por outro lado, em casos de diarreia, colite, adenoma viloso e durante ou após o uso de antibióticos, o pH é levemente alcalino. Esta determinação é efetuada com recurso a papel indicador de pH.

### *Pesquisa de substâncias redutoras*

A pesquisa de substâncias redutoras nas fezes é utilizada para detetar deficiências congénitas de enzimas da mucosa intestinal, nomeadamente as dissacaridases (lactase e sacarase). A má absorção de lactose e outros dissacáridos que esta deficiência causa determina o aparecimento das substâncias redutoras nas fezes, nomeadamente a sacarose e a glicose, sendo que o pH será também ácido.

O pH fecal e a pesquisa de substâncias redutoras nas fezes podem então ser utilizados em conjunto como triagem de má absorção de hidratos de carbono.

### *Pesquisa de sangue oculto*

A pesquisa de sangue oculto nas fezes é efetuada através de um ensaio imunocromatográfico qualitativo, que deteta Hb nas fezes através de anticorpos anti-Hb presentes numa membrana. Durante o teste, a suspensão de fezes reage com as partículas revestidas com

anticorpo anti-Hb. À medida que migra ao longo da membrana por capilaridade. Caso seja positiva, surge então uma linha colorida na membrana de teste.

Este exame permite auxiliar ao diagnóstico precoce de perturbações do trato gastrointestinal ainda antes do aparecimento dos sintomas: são exemplos a úlcera péptica, a gastrite erosiva, o carcinoma gástrico, o carcinoma e pólipos adenomatosos colorrectais.

#### *Leucócitos nas fezes*

Normalmente, não são encontrados leucócitos no material fecal, razão pela qual a sua presença indicia um processo infeccioso ou inflamatório do trato intestinal (mais frequentemente uma infeção bacteriana). Leucócitos fecais em grande número costumam ser indicativos da presença de *Escherichia coli* enteropatogénica, *Salmonella* spp. ou *Shigella* spp., assim como de amebíase, colite ulcerosa e doenças inflamatórias intestinais. A sua pesquisa consiste na observação ao microscópio ótico de uma suspensão de fezes em soro fisiológico.

#### *Pesquisa de Helicobacter pylori*

A *Helicobacter pylori* é um bacilo Gram-negativo de forma helicoidal que vive na camada mucosa do estômago e duodeno e que causa úlceras pépticas e gastrite crónica nos pacientes afetados, estando também associada ao surgimento de carcinomas gástricos. Pode ser detetada por serologia, pesquisa dos seus antígenos nas fezes ou endoscopia digestiva com biópsia da mucosa gástrica.

Este teste tem como finalidade a pesquisa dos antígenos de *Helicobacter pylori* nas fezes através da aglutinação em latex ligado a anticorpos monoclonais contra os antígenos de *Helicobacter pylori*.

#### *Pesquisa de anticorpos para rotavírus e adenovírus*

É uma pesquisa apenas efetuada em pacientes até aos cinco anos de idade, que apresentem sintomas de diarreia e gastroenterite.

O teste baseia-se num ensaio imunocromatográfico que utiliza dois anticorpos monoclonais conjugados com partículas de ouro, dirigidos quer contra as proteínas do adenovírus humano (antígeno Hexon) quer contra as proteínas VP6 do grupo A, específicas do rotavírus humano. Caso o anticorpo esteja presente no soro, ocorre a formação do complexo antígeno-anticorpo e surge uma linha visível na membrana.

#### *Pesquisa de antígenos de Giardia spp. e Cryptosporidium spp.*

A pesquisa qualitativa dos antígenos dos cistos de *Giardia* spp. e dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. nas fezes é efetuada através de um ensaio imunocromatográfico. Este imunoensaio utiliza anticorpos monoclonais e policlonais específicos para proteínas da



superfície dos cistos de *Giardia* spp. e dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e ainda anticorpos secundários conjugados a peroxidase. Assim, se a amostra de fezes contiver antígenos de *Giardia* spp. e *Cryptosporidium* spp., surge uma linha azul, indicadora de um resultado positivo.

# Imunohemoterapia

## Introdução

O Serviço de Imunohemoterapia (SIH), dirigido pela Dr.<sup>a</sup> Maria Luz Dobao Gonzalez, está vocacionado para a implementação de metodologias técnico-científicas de modo a assegurar a qualidade e segurança transfusional e intervir no diagnóstico e terapêutica de situações clínicas definidas no âmbito da Medicina Transfusional.

A área laboratorial de Imunohematologia é, portanto, responsável pela disponibilização de componentes sanguíneos para os diferentes Serviços do CHPVVC, mediante a implementação de uma rede transfusional desenhada para satisfazer as necessidades de hemoterapia e hemovigilância, em constante cooperação entre o Laboratório, os Serviços Clínicos e o Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST).

Neste sentido, o SIH efetua um conjunto de provas laboratoriais pré-transfusionais bem definido. No entanto, para o sucesso de uma transfusão de sangue, uma correta e atenta identificação do doente recetor e de todas as características imunofenotípicas do sangue do dador é essencial. Mais concretamente, a verificação do correto preenchimento da requisição de provas pré-transfusionais e da identificação das amostras de forma correta é fundamental. Os erros de identificação do doente e/ou da amostra de sangue são os principais responsáveis pelas reações transfusionais graves que põem em risco a vida do doente.

O método utilizado no SIH para efetuar as referidas provas é o de gel em coluna do sistema ID-Diamed™.

## Provas pré-transfusionais

As provas pré-transfusionais efetuadas no âmbito do SIH permitem assegurar que os doentes recebem unidades de sangue totalmente compatíveis, de dadores saudáveis, contendo os componentes sanguíneos de que necessitam.

## Determinação do grupo sanguíneo ABO

A determinação do grupo sanguíneo ABO é um dos parâmetros de maior importância dentro da Imunohematologia, com implicações em transfusões e transplantação. Os antígenos ABO são expressos ao nível da membrana eritrocitária, endotelial e epitelial, desempenhando um papel muito importante como antígenos de histocompatibilidade.

O Sistema ABO é, assim, o mais relevante no SIH devido à sua imunogenicidade. Para tal, a fenotipagem no sistema ABO é composta pela **prova globular ou direta** e pela **prova sérica ou reversa**.

### *Prova direta*

Na prova direta, é testada uma suspensão obtida a partir do sedimento eritrocitário do doente com soros comerciais contendo anticorpos anti-A, anti-B e anti-AB.

### *Prova reversa modificada*

Na prova reversa modificada, é testado o soro do doente com eritrócitos-teste A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B e O, de modo a detetar a presença de Anti-B.

### *Determinação do grupo sanguíneo Rh*

A fenotipagem eritrocitária Rh D deve ser efetuada em todas as amostras pré-transfusionais. Esta prova consiste na pesquisa do antígeno D nos eritrócitos, utilizando soros comerciais contendo anticorpos anti-D. A presença do antígeno D define, assim, o fenótipo Rh D positivo.

O antígeno D pode ainda apresentar expressões mais leves, por diminuição da sua expressão (D fraco) e/ou por expressão de um antígeno D mutado ou híbrido (D parcial). A determinação do antígeno D pode ser efetuada em tubo, microplaca, aglutinação em coluna ou por outros métodos de sensibilidade e especificidade semelhantes. Os resultados devem ser sempre comparados com registos anteriores e esclarecidas eventuais discrepâncias.

Para efeitos confirmatórios ou em casos urgentes, a determinação do grupo ABO e Rh é executada em tubo.

### *Prova de compatibilidade (cross-matching)*

As provas de compatibilidade têm como objetivo verificar *in vitro* a compatibilidade eritrocitária entre dador e recetor.

Através das provas de compatibilidade, deve ser possível detetar incompatibilidades causadas por anticorpos, em especial do sistema ABO, pela gravidade das reações pós-transfusionais que provocam.

As provas de compatibilidade são executadas em meio de antiglobulina humana (AGH) e meio enzimático com papaína, entre o soro do doente e os eritrócitos do dador. O soro de Coombs contém anticorpos contra anticorpos humanos e desta forma conseguimos detetar anticorpos que estão a sensibilizar os eritrócitos.

### *Teste de Coombs direto*

Este teste permite determinar se os eritrócitos do doente estão sensibilizados com imunoglobulinas e/ou proteínas do sistema de complemento, nomeadamente Ig G e/ou C3d.

Esta prova consiste num **teste de antiglobulina humana direto**, no qual os anticorpos fixos sobre os eritrócitos são detetados através de reação de aglutinação com um soro comercial com antiglobulinas humanas. Este reagirá com os anticorpos à superfície dos eritrócitos sensibilizados, provocando a sua aglutinação.

#### *Pesquisa de anticorpos irregulares (PAI)*

A PAI ou teste de Coombs indireto tem como objetivo a deteção de anticorpos anti-eritrocitários clinicamente relevantes no soro, designados **anticorpos irregulares**. Nesta prova, pesquisam-se anticorpos potencialmente causadores de reações pós-transfusionais.

A PAI deve realizar-se:

- Como teste pré-transfusional a todos os doentes que possam vir a ser submetidos a transfusões de sangue e/ou respetivos componentes.
- No estudo de reações pós-transfusionais
- A todas as grávidas.

#### *Painel fenotípico alargado*

Se a PAI for positiva deve proceder-se à identificação da especificidade do(s) anticorpo(s) presentes no soro do paciente. Na identificação de anticorpos, utilizam-se suspensões eritrocitárias de dadores selecionados do grupo O, com fenótipo conhecido, adquiridas em painéis de 11 células. Deste modo, a probabilidade de identificar corretamente a especificidade do anticorpo será maior.

Esta prova é efetuada em meio de AGH e enzimático a 37°C, sendo que, nas mulheres grávidas, deve ser determinado o título de anticorpos encontrados.

#### *Provas pré-transfusionais em recém-nascidos*

Aos recém-nascidos do Serviço de Neonatologia do CHPVVC, é executado um perfil para determinação do grupo sanguíneo: tipagem ABO pela prova celular ou direta, Rh D e teste de antiglobulina direto num único procedimento em *card* específico para estes pacientes – *DiaClon® ABO/Rh for newborns*.

#### **Controlo de Qualidade**

O controlo de qualidade interno em Imunohemoterapia permite controlar todo o procedimento, bem como a viabilidade dos *cards*, suspensões celulares e de anticorpos. É efetuado todos os dias, utilizando amostras comerciais exclusivamente destinadas a este fim, cujo fenótipo é conhecido. Logo, o controlo de qualidade é efetuado com sucesso quando o fenótipo obtido coincide com aquele previamente atribuído à respetiva amostra. É registado diariamente o resultado deste controlo.

## Conclusão

A rotina laboratorial no Serviço de Patologia Clínica exige um conjunto de conhecimentos teóricos e práticos nas mais diversas áreas da prática clínica, que devem ser permanentemente atualizados ao longo da vida profissional ativa.

A abrangência do conhecimento exigido em Análises Clínicas e as suas plurivalências obrigam cada vez mais a uma formação direcionada. O aprofundamento progressivo do conhecimento educacional em determinada área específica é cada vez mais necessário, e permitirá com mais facilidade a obtenção de resultados profissionais e pessoais proveitosos e com qualidade.

Após a componente teórico-prática do primeiro ano do Mestrado em Análises Clínicas, que permitiu relembrar conceitos e adquirir mais conhecimentos teóricos, este período de Estágio Curricular permitiu aplica-los num contexto futuramente profissional. Este relatório foi, por isso, essencial para rever os conhecimentos teóricos e consolidar a experiência laboratorial, bem como aprofundar a matéria lecionada ao longo de mestrado pelas diversas disciplinas.

Durante este período, foi possível testar e controlar os métodos usados na execução das análises clínicas, colaborar na obtenção das amostras e sua manipulação, informar e preparar os doentes para a correta obtenção das mesmas e colaborar no processo de certificação da qualidade, participando em programas intra e inter-laboratoriais de avaliação externa da qualidade e trabalhar em equipa multidisciplinar focalizada no utente. Neste sentido, a realização do estágio no Serviço de Patologia Clínica do CHPVVC E.P.E. foi extremamente vantajosa, na medida em que adquiri conhecimentos não só de cariz prático, mas também teórico, que permitiram consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos durante a fase curricular do Mestrado de Análises Clínicas. Além disso, o estágio reportado no presente relatório contribuiu para a sensibilização para a responsabilidade que os Técnicos de Análises Clínicas, Técnicos Superiores de Saúde, Patologistas Clínicos e restante pessoal tem em assegurar a qualidade de todo o processo analítico até à validação biopatológica, sendo sempre essencial o seu espírito crítico.

## Referências bibliográficas

- Manual de Colheitas e Transporte do Serviço de Patologia Clínica e Imunohemoterapia do CHPVVC – 1ª edição, Póvoa de Varzim, 2007
- Orientações para a Elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia – Programa Nacional de Controlo de Infecção (PNCI) – Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Portugal, 2004
- Musher, D., Thorner, A. Community-Acquired Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371(17), pp.1619-1628.
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D. and Piddock, L. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2014; 13(1), pp.42-51.
- Pereira, P. et al. Manual de Colheitas do Laboratório de Microbiologia do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (Hospital Egas Moniz) – 1ª edição, Lisboa, 2001.
- Turnidge, J e Bell, J, Questions and Answers on Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria and Fungi – BioMérieux booklets Empowering Clinical Decisions.
- BioMérieux SA, VITEK® 2 Compact Operation Summary. Marcy l'Etoile, França, 2005.
- BioMérieux SA, API® & ID 32 Identification Databases, Marcy l'Etoile, França, 2015.
- Grabe, M. et al (2009), Orientações sobre Infecções Urológicas – folheto informativo da Associação Europeia de Urologia.  
Disponível em [www.uroweb.org](http://www.uroweb.org) , consultado em 23 de Fevereiro de 2016
- Bain, Barbara J. Blood Cells – A Practical Guide, 5ª edição.
- Bain, Barbara J. Diagnosis from the Blood Smear, *New England Journal of Medicine*. 2005 353(5), pp. 498-507.
- Jawetz, M e Adelberg; LANGE Medical Microbiology - Mc Graw Hill, 22ª edição, 2001.
- Hoffbrand, A. V., Pettit, J. E., & Moss, P. A. H. (2001). *Essential Haematology*. Oxford: Blackwell Science.
- Nakul-Aquaronne, D. (2003), Evaluation of the Sysmex XE-2100® hematology analyzer in hospital use, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*; 17(4), 1098-2825.
- Norma da Direção-Geral de Saúde nº 030/2013 de 31/12/2013, atualizada a 09/04/2015 - Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropenia no Adulto.
- Angulo, Ivan de Lucena, Interpretação do hemograma clínica e laboratorial – Ribeirão Preto
- Singh, Virendra et al. (2013), Blood gas analysis for bedside diagnosis. *National Journal of Maxillofacial Surgery*, 4(2), pp. 136-141.

- Virginia Commonwealth University, Dept. of Pathology - Hemostasis Educational Resources – Dr. Roger S. Riley, MD PhD.  
Disponível em [www.pathology.vcu.edu/clinical/coag/education.html](http://www.pathology.vcu.edu/clinical/coag/education.html) , consultado em 28 de Março de 2016
- Comar, Samuel Ricardo et al. (2009), Análise Citológica do Líquido Cefalorraquidiano, Estud. Biol., 31(73/74/75), pp. 93-102.
- Sadler, J. E. (1998). "Biochemistry and genetics of von Willebrand factor". Annu. Rev. Biochem. **67**: 395–424.
- Irmen, K. E., & Kelleher, J. J. (2000). Use of Monoclonal Antibodies for Rapid Diagnosis of Respiratory Viruses in a Community Hospital. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7(3), 396–403.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde do Brasil, Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica (Módulo V)
- Mermel, Leonard A. et al (2001), Guidelines for the Management of Intravascular Catheter-Related Infections, Clin Infect Dis. 32 (9): 1249-1272
- Tietz, N. W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 3ª edição, W.B. Saunders Company
- Preventing bloodstream infections from central line venous catheters – Patient Safety; guidelines da Organização Mundial de Saúde  
Disponível em [www.who.int/patientsafety/implementation/bsi/en/](http://www.who.int/patientsafety/implementation/bsi/en/) , consultado em 19 de Março de 2016
- Sebia Products – Gel Electrophoresis  
Disponível em [www.sebia.com/en-EN/groupeproduits/gel-electrophoresis](http://www.sebia.com/en-EN/groupeproduits/gel-electrophoresis) , consultado em 05 de Abril de 2016
- Bossuyt, X. et al. (1998), Serum protein electrophoresis and immunofixation by a semiautomated electrophoresis system, Clinical Chemistry 44, p.944-949.
- Roche Diagnostics Ltd. (2010), Compendium of urinalysis - Urine test strips and microscopy
- P. Migliorini et al (2004), Anti-Sm and anti-RNP antibodies, Autoimmunity, 38(1) 47-54.
- Shinjo, Samuel Katsuyuki, & Levy-Neto, Mauricio. (2010). Síndrome antissintetase anti-Jo-1. Revista Brasileira de Reumatologia, 50(5), 492-500.
- Targoff, I. N. and Reichlin, M. (1985), The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis. Arthritis & Rheumatism, 28: 796–803.
- Thermo-Scientific™/Phadia™: Doenças autoimunes e o princípio do teste EliA

Disponível em [www.phadia.com/pt-PT/5/Testes/Principio-de-Teste-IgA-Especifico-ImmunoCAP/](http://www.phadia.com/pt-PT/5/Testes/Principio-de-Teste-IgA-Especifico-ImmunoCAP/) e [www.phadia.com/pt-BR/Diagnostico-de-auto-imunidade/Diseases/](http://www.phadia.com/pt-BR/Diagnostico-de-auto-imunidade/Diseases/), respectivamente, consultados em 06 de Abril de 2016

- Alves, M (2004), Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação de Proteinúria e Sedimento Urinário. J. Bras. Nefrol ;26(3):6-8
- Ratnam, S. (2005). The laboratory diagnosis of syphilis. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 16(1), 45–51.
- Microbiology Notes: Widal Test - Introduction, Principle, Procedure, Interpretation and Limitation (Sagar Aryal, MSc Medical Microbiology)  
Disponível em [www.microbiologyinfo.com/widal-test-introduction-principle-procedure-interpretation-and-limitation/](http://www.microbiologyinfo.com/widal-test-introduction-principle-procedure-interpretation-and-limitation/), consultado em 07 de Abril de 2016.
- What Is Brucellosis? – WebMD  
Disponível em [www.webmd.com/a-to-z-guides/brucellosis-symptoms-treatment](http://www.webmd.com/a-to-z-guides/brucellosis-symptoms-treatment), consultado em 07 de Abril de 2016
- MedLine Plus Medical Encyclopedia – Mononucleosis spot test  
Disponível em [www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003454.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003454.htm), consultado em 07 de Abril de 2016
- Naumova N. et al. (2006), Reducing Substances in Urine: a Paradigm for Changes in a Standard Test, Ann Clin Lab Sci 36(4):447-448
- EUROIMMUN™ Products for Hepatology and Autoimmune Hepatitis  
Disponível em [www.euroimmun.com/produkte/indikationen/autoantikrper-diagnostik/hepatologie/autoimmune-hepatitis/aak-gegen-glatte-muskulatur-asma.html](http://www.euroimmun.com/produkte/indikationen/autoantikrper-diagnostik/hepatologie/autoimmune-hepatitis/aak-gegen-glatte-muskulatur-asma.html), consultado em 07 de Abril de 2016.
- P. Migliorini, C. Baldini, V. Rocchi, S. Bombardieri (2005), Anti-Sm and anti-RNP antibodies, Autoimmunity, 38(1)
- Syphilis Tests – “Lab Tests Online”  
Disponível em [labtestsonline.org/understanding/analytes/syphilis/tab/test/](http://labtestsonline.org/understanding/analytes/syphilis/tab/test/), consultado em 18 de Abril de 2016
- Maddison, P. J. et al (1985). Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. Clinical and Experimental Immunology, 62(2), 337–345.